

# **Entwicklung von PLGA-Nanopartikeln als *Drug Delivery System* für lipophile Wirkstoffe, die in die Arachidonsäurekaskade eingreifen**



---

seit 1558

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Fakultät Biowissenschaften der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Pharmazeut Sven-Desiderius Kattner**

**geboren am 26.06.1985 in Bad Kissingen**

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dagmar Fischer; Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie; Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Gerhard K. E. Scriba; Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie; Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Oliver Germershaus; Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Hochschule für Life Sciences, Fachhochschule Nordwestschweiz in Muttenz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25.11.2020

# Danksagung

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung und die Motivation die sie mir geben, um neue Herausforderungen zu meistern. Besonders meine Frau **Alexandra** und meine Tochter **Ariana** geben mir täglich Liebe und Rückhalt.

Ich möchte **Prof. Dr. Dagmar Fischer** für die Möglichkeit danken, meine Promotion unter ihrer Betreuung am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie durchführen zu dürfen und für die Unterstützung im Rahmen meiner Promotion sowohl in wissenschaftlicher Hinsicht, als auch hinsichtlich meiner persönlichen Weiterentwicklung.

**Prof. Dr. Oliver Werz** und **Erik Romp** aus dem Lehrstuhl für Pharmazeutischen Chemie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht neben **Dr. Matthias Zink** an meine Kollegen aus dem Männerbüro, bestehend aus **Yaser Alkathib**, **Paul Warncke** und **Martin Rabel**, für eine tolle Zeit, befruchtende Diskussionen und Austausch innovativer Ideen.

Bei **Dr. Dana Kralisch** und **Dr. Gabriele Blume** möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Laborgeräte und Chemikalien und die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Ich möchte mich bei **Angela Herre**, **Ramona Brabetz** und **Dr. Jana Thamm** für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei meinen Laborarbeiten bedanken. Für die technische Unterstützung möchte ich mich bei **Alexander Mohn** bedanken. Zudem möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie für die wunderschöne Zeit und die tolle Zusammenarbeit danken.

Ein großer Dank geht abschließend an meine fleißigen Korrekturleser **Dr. Semjon Seemann** und **Dr. Stephan Holzschuh**, die mich durch ihre Anregungen und Korrekturvorschläge unterstützen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Poly(lactid-co-glycolid) -Nanopartikel .....	6
1.1.1	Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem .....	9
1.1.2	Herstellung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel durch Emulsionsverfahren .....	10
1.1.3	Physikochemische Charakterisierung von PLGA-Nanopartikeln als Wirkstoffträgersystem .....	14
1.1.4	Biokompatibilität von PLGA-Nanopartikeln .....	15
1.2	Hilfstoffe .....	16
1.2.1	Albumin.....	16
1.2.2	Chitosan .....	17
1.3	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	18
1.3.1	Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	19
1.3.2	Arachidonsäurekaskade .....	21
1.4	Innovative lipophile Wirkstoffe zur antiinflammatorischen Therapie.....	25
1.4.1	Embelin .....	25
1.4.2	Retinol.....	26
1.5	Hühnerei-Test an der <i>Chick-Area-Vasculosa</i> (HET-CAV) als <i>ex ovo</i> -Modell zur Bewertung von toxikologischen Profilen .....	28
1.6	Wirkstofffreisetzung und -abtransport innerhalb des Caco-2-Modells .....	31
1.7	Zielstellung.....	33
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1	Herstellung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikeln .....	34
2.1.1	Aufreinigung von PLGA-Nanopartikeln .....	35
2.1.2	Gefriertrocknung der beladenen und unbeladenen PLGA-Nanopartikel.....	35
2.2	Physikochemische Charakterisierung von PLGA-Nanopartikel .....	35
2.2.1	Vermessung mit Lichtstreutechniken .....	35
2.2.2	Elektronenmikroskopie .....	36
2.2.3	Photostabilitätstest.....	36
2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	37
2.3.1	HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Embelin.....	38
2.3.2	HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung für Retinol.....	38
2.3.3	Berechnung der Beladungseffizienz und des Beladungsgrades der verwendeten Wirkstoffe .....	39

2.4	<i>In vitro</i> -Freisetzung .....	40
2.5	Antiinflammatorische Aktivität in humanen neutrophilen Granulozyten.....	40
2.6	Zellkultur .....	41
2.6.1	CellTiter-Glo®-Assay.....	42
2.6.2	Kultivierung von Caco-2-Zellen .....	43
2.7	Der schalenlose Hühnerei-Test an der <i>Chick-Area-Vasculosa</i> (HET-CAV).....	44
2.7.1	Lokaler Hühnerei-Test an der <i>Chick-Area-Vasculosa</i> .....	44
2.7.2	Systemischer Hühnerei-Test an der <i>Chick-Area-Vasculosa</i> .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1	Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel – Herstellung und Charakterisierung .	46
3.1.1	Übersicht über den Prozessablauf .....	46
3.1.2	Methodenentwicklung der Nanopartikelherstellung.....	49
3.1.3	Physikochemische Charakterisierung von unbeladenen PLGA-Nanopartikeln .....	53
3.1.4	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Nanopartikel-Morphologie.....	54
3.1.5	Embelin-beladene PLGA-Nanopartikel.....	56
3.1.6	Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel .....	59
3.2	Biokompatibilitätsprofil der entwickelten Wirkstoffträgersysteme .....	65
3.2.1	Auswertung des CellTiter-Glo®-Assays.....	66
3.2.2	Der schalenlose Hühnerei-Test an der <i>Chick-Area-Vasculosa</i> .....	69
3.3	Simulation der intestinalen Wirkstofffreisetzung am Caco-2-Zellmonolayer .....	78
3.3.1	Intestinale Wirkstofffreisetzung von Embelin aus beladenen PLGA-Nanopartikeln .....	79
3.3.2	Intestinale Wirkstofffreisetzung von Retinol aus beladenen PLGA-Nanopartikeln .....	82
3.4	Antiinflammatorische Aktivität der beladenen PLGA-Nanopartikeln in humanen neutrophilen Granulozyten .....	86
3.4.1	Antiinflammatorische Aktivität der Embelin-beladenen PLGA-Nanopartikel.....	87
3.4.2	Antiinflammatorische Aktivität der Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikel .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>

## 1 Einleitung

Die Entwicklung neuer Arzneimittel für eine immer älter werdende Gesellschaft ist nach wie vor eine große Herausforderung unserer Zeit. Durch den technologischen Fortschritt können durch computergestütztes „*molecular modelling*“ neue Wirkstoffe kreiert werden, die für den Angriff einer entsprechenden Zielstrukturen (z. B. Rezeptor oder Enzym) optimiert sind, um den größtmöglichen Effekt zu erzielen [1, 2]. Trotz dieses Fortschritts erreichen nur etwa ein bis zwei Wirkstoffe aus 10 000 die Zulassung als Arzneistoff [3, 4]. Viele Wirkstoffe – ob natürlichen Ursprungs oder synthetisch – werden aufgrund eines ungünstigen toxikologischen Profils, schlechter Bioverfügbarkeit oder chemischer Instabilität aussortiert. Sowohl Naturstoffe als auch synthetische Wirkstoffe unterliegen nach Applikation in den menschlichen Körper einer Vielzahl an metabolischen Prozessen. Diese können dazu führen, dass ein Wirkstoff inaktiviert wird, bevor er den Zielort erreicht. Um diese Wirkstoffe dennoch für die Behandlung von Krankheiten verfügbar zu machen, müssen für die entsprechenden Wirkstoffe neue Wirkstoffträgersysteme entwickelt werden, die auf die Applikationsart, physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs und therapeutischen Anforderungen optimiert werden. Aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften können sich Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA vom engl. „*poly(lactic-co-glycolic acid)*“) -Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem vor allem für lipophile Wirkstoffe eignen [5].

### 1.1 Poly(lactid-co-glycolid) -Nanopartikel

Gemäß der Definition nach ISO/TS 80004-1:2015 besitzen Nanopartikel eine Größe zwischen 1 – 1000 nm. Üblicherweise gilt jedoch die Definition der Europäischen Kommission, nach der sphärische Partikel als Nanopartikel gelten, wenn sie einen Durchmesser von 1 – 100 nm aufweisen. Zudem gilt: „*ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben.*“ als Nanomaterial [6]. Allerdings wird weder festgelegt nach welcher Messmethode die Größe bestimmt werden soll, noch wie die statistische Auswertung zu erfolgen hat. Oft wird eine Kombination aus bildgebenden Verfahren (z. B. Rasterelektronenmikroskopie) und dynamischen Lichtstreuungsverfahren zur Größenbestimmung der Nanopartikel genutzt und eine statistische Auswertung über den Polydispersitätsindex (PDI) durchgeführt.

Für die Herstellung von Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem stehen grundsätzlich viele verschiedene Trägermaterialien zur Verfügung. Häufig werden dafür Makromoleküle in Form von organischen Polymeren eingesetzt. Dabei wird zwischen natürlichen und synthetischen Polymeren unterschieden, wobei diese Klassifizierung weder Rückschlüsse auf die Bioabbaubarkeit, noch auf das toxikologische Profil des Polymers zulässt [7]. Gegenwärtig werden für die Herstellung von polymerbasierten Nanopartikeln als Wirkstoffträgersystem vor allem synthetische Polymere wie Polycaprolacton, Polyglutaminsäure, Polybutylcyanoacrylat und PLGA eingesetzt, da hier die mittlere Molekülmasse, die Kettenlänge, Kettenverzweigung und die Zusammensetzung bei Co-Polymeren (z. B. PLGA) angepasst werden können [8, 9]. Insbesondere die Oberfläche der hergestellten Nanopartikel kann derart modifiziert werden, dass eine selektive Bindung am Zielort möglich ist. Ferner besteht die Möglichkeit die Partikel zu maskieren, um sie für das Immunsystem „unsichtbar“ zu machen („*stealth effect*“), wodurch eine Eliminierung verlangsamt, die Wirkdauer verlängert und eine inflammatorische Immunantwort vermieden werden kann [10-12].

Unabhängig vom Polymertyp und der Oberflächenbeschaffenheit zeigen Nanopartikel aufgrund ihrer Größe *per se* eine passive Selektivität gegenüber Krebszellen. Begründet liegt dies in einer erhöhten Permeabilität und Retention (EPR) der Nanopartikel. Tumorzellen schütten oft eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren aus, die eine erhöhte Angiogenese und Proliferation bedingen können und damit zu einem schnelleren Wachstum des Tumors führen. Durch das rasche Wachstum weisen die dabei entstehenden Blutgefäße oft eine pathologisch veränderte Struktur auf. Dies resultiert in durchlässigen Kapillargefäßen, auch als fenestrierte Blutgefäße bezeichnet. Die Fenestrierungen bzw. die Lücken der Endothelzellen weisen üblicherweise eine Größe von 200 nm bis 900 nm auf [13, 14]. Dieser Umstand ermöglicht es Nanopartikeln, die ein gesundes Blutgefäßendothel normalerweise nicht durchdringen können, in Tumorgewebe einzudringen (erhöhte Permeabilität). Im Gegensatz zu gesundem Gewebe bilden sich um die schnell proliferierenden Tumorzellen oft nur wenig Lymphgefäße und vorhandene Lymphgefäße können durch invasiv wachsendes Tumorgewebe beeinträchtigt werden [15, 16]. Aufgrund des eingeschränkten Lymphsystems und der daraus resultierenden verminderten Diffusion in dieser Umgebung, ist die Verweildauer von Nanopartikeln im Tumorgewebe meist erhöht (erhöhte Retention).

Das erste Arzneimittel mit Nanoformulierung, welches sich den EPR-Effekt zu Nutze machte, war Doxil®, welches 1995 von der *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurde. Durch die spezielle Formulierung und den daraus resultierenden EPR-Effekt konnten die Dosis und die entsprechenden Nebenwirkungen (z. B. die Kardiotoxizität) von Doxorubicin bei gleicher Wirkung reduziert werden [17]. In Deutschland ist als Nanoformulierung derzeit Abraxane® (Paclitaxel, gebunden an Humanalbumin) zur Behandlung von Brustkrebs auf dem Markt. Hierbei war es ebenso möglich die Wirkstoffmenge, im Vergleich zur Injektionslösung, mit Hilfe der Nanoformulierung zu verringern und ein besseres Nutzen-Risiko-Profil zu erreichen [18]. Der EPR-Effekt lässt sich nicht nur in Tumorgewebe, sondern auch in entzündetem Gewebe, speziell bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, beobachten [19]. Auch dort kann die Permeabilität der Gefäße durch eine gestörte Barriere-Funktion der Zellen erhöht sein [20, 21].

Da die Applikation von Nanopartikeln oft parenteral erfolgt, und Nanopartikel in Berührung mit unterschiedlichen Blutbestandteilen, Zelltypen, Proteinen etc. kommen, ist eine gute Biokompatibilität oder Bioabbaubarkeit besonders wichtig. Beide Eigenschaften vereint PLGA. Zudem kann PLGA den Wirkstoff vor Abbau durch äußere Einflüsse schützen und es sind bereits zahlreiche Anwendungen durch die FDA und die *European Medicines Agency* (EMA) für parenterale Anwendungen zugelassen, in denen es als Wirkstoffträger fungiert [19, 22]. PLGA wird als „allgemein sicher“ (GRAS vom engl. „*generally recognized as safe*“) von der FDA anerkannt und ist somit von Beschränkungen hinsichtlich einer täglichen (oralen) Aufnahme ausgenommen [23]. Chemisch betrachtet ist PLGA ein synthetischer, bioabbaubarer Polyester aus Milchsäure und Glycolsäure (Abbildung 1-1). Die Monomere werden entweder unverändert renal ausgeschieden oder über den Citratzyklus verstoffwechselt. Die Kondensation der beiden Säuren erfolgt an der Carboxylgruppe mit der  $\alpha$ -ständigen Hydroxylgruppe in unterschiedlichen Verhältnissen. PLGA weist aufgrund der endständigen Carboxyl- und der zahlreichen Carbonylgruppen, eine negative Oberflächenladung auf. Es besitzt aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit seiner Esterbindungen und den daraus resultierenden freien Carboxylgruppen im wässrigem Milieu einen sauren Charakter. Dies resultiert in einem autokatalytischen Abbau, sofern der pH-Wert nicht stabilisiert wird.



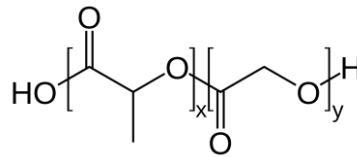


Abbildung 1-1: **Schematische Darstellung der Struktur von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA).** PLGA ist aus Milchsäure<sub>(x)</sub>- und Glycolsäure<sub>(y)</sub>-Monomeren in beliebigem Verhältnis zusammengesetzt.

Prinzipiell ist durch die Formulierung von Wirkstoffen in PLGA-Mikropartikeln oder PLGA-Implantaten eine Freisetzung von einigen Wochen bzw. mehreren Monaten möglich. Für eine Wirkstofffreisetzung innerhalb einiger Stunden bis wenigen Tagen, wird PLGA meist in Form von Nanopartikeln eingesetzt. Die meisten Herstellungsmethoden für PLGA-Nanopartikel führen zu monolithischen Sphären mit einer mehr oder weniger porösen PLGA-Matrix. In dieser Matrix liegt der Wirkstoff eingelagert oder an der Oberfläche adsorbiert vor [24, 25].

### 1.1.1 Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem

Wirkstoffträgersysteme können zum einen die Pharmakokinetik von Wirkstoffen beeinflussen und dadurch Nebenwirkungen bzw. das Intoxikationsrisiko verringern und zum anderen insbesondere innovative Wirkstoffe, die hochpotent aber anfällig gegenüber äußeren Einflüssen sind, schützen und dementsprechend in beiden Fällen zusätzliche Wirkstoffe therapeutisch zugänglich machen [26-28].

Die Größe der einzusetzenden PLGA-Partikel sollte je nach angedachtem Anwendungsgebiet gewählt werden. Bei einer gewünschten Freisetzung des Wirkstoffes über einige Stunden oder systemischer Applikation, sind Mikropartikelformulierungen unter therapeutischen Aspekten wenig sinnvoll. Nanopartikel sollten für eine systemische Applikation eine Größe von unter 200 nm aufweisen, da diese aus der systemischen Zirkulation meistens weniger rasch eliminiert werden und zudem die Möglichkeit einer Sterilfiltration bieten [29, 30]. Bei oraler Gabe und einer gezielten Freisetzung im Colon sollte eine Freisetzung innerhalb 12 h erfolgen [31, 32]. PLGA-Partikel werden nach erfolgter Endozytose durch den dadurch ausgelösten Protonen-Einstrom schnell abgebaut und der Wirkstoff kann gezielt intrazellulär freigesetzt werden [33]. Durch das verhältnismäßig kleine Volumen der PLGA-Nanopartikeln entsteht durch die Hydrolyse des PLGA eine weniger saure Mikroumgebung im Inneren der Partikel, verglichen zu Mikropartikeln oder Implantaten [34]. Daher können PLGA-Nanopartikel auch eher bei säurelabilen Wirkstoffen als Trägersystem eingesetzt werden und die Wahrscheinlichkeit für eine Kristallisierung des Wirkstoffes im Inneren verringert sich [35]. Die

vollständige Benetzung mit Wasser erfolgt bei PLGA-Nanopartikeln innerhalb von wenigen Minuten [36, 37]. Basierend auf dem Krümmungsdruck wird die Freisetzung des beladenen Wirkstoffes unterstützt. Die Korrelation zwischen Partikelgröße und Krümmungsdruck lässt sich mit Hilfe der Young-Laplace-Gleichung für Flüssigkeiten beschreiben und nach Hawa *et al.* auch auf Nanopartikel übertragen [38].

$$\Delta p = \frac{2 \cdot \gamma}{r}$$

*Formel 1-1: Young-Laplace-Gleichung. In einem sphärischen Körper lässt sich der erhöhte Druck als Krümmungsdruck ( $\Delta p$  [N/m<sup>2</sup>]) im Inneren durch die Oberflächenspannung ( $\gamma$  [N/m]) im Verhältnis zum Partikelradius ( $r$  [m]) bestimmen. Somit ist der Druck innerhalb des Partikels umgekehrt proportional zur Partikelgröße, d. h. je kleiner der Partikel desto größer wird der Druck im Inneren.*

Durch das geringe Volumen der Nanopartikel spielt die erosionskontrollierte Freisetzung meist nur eine untergeordnete Rolle [35, 39]. Daraus resultierend zeigen PLGA-Nanopartikel in der Regel ein durch Diffusion dominiertes Freisetzungsverhalten und meist keine mehrphasige Freisetzung, die für PLGA-Mikropartikel charakteristisch wäre [40]. Ein Teil des Wirkstoffes wird oft direkt bei der Benetzung der PLGA-Nanopartikel als „*Burst-Release*“ freigesetzt, da sich durch das kleine Volumen der PLGA-Nanopartikel dieser Teil an oder nahe der Oberfläche befindet [41]. Basierend darauf fällt die physikochemische Wechselwirkung zwischen PLGA-Matrix und Wirkstoff bezüglich des Freisetzungsverhaltens stark ins Gewicht. Nach dem Aushärtungsprozess während der Herstellung der PLGA-Nanopartikel liegt der Wirkstoff oft molekulardispers verteilt in der PLGA-Matrix vor, dies wird auch als Löslichkeit des Wirkstoffes im Polymer bezeichnet. Die Hansen-Löslichkeitsparameter, die sich in dispersive Wechselwirkungen, polare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen unterteilen lassen, können zur Abschätzung der Löslichkeit eines Wirkstoffes im entsprechenden Polymer herangezogen werden [42].

### 1.1.2 Herstellung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel durch Emulsionsverfahren

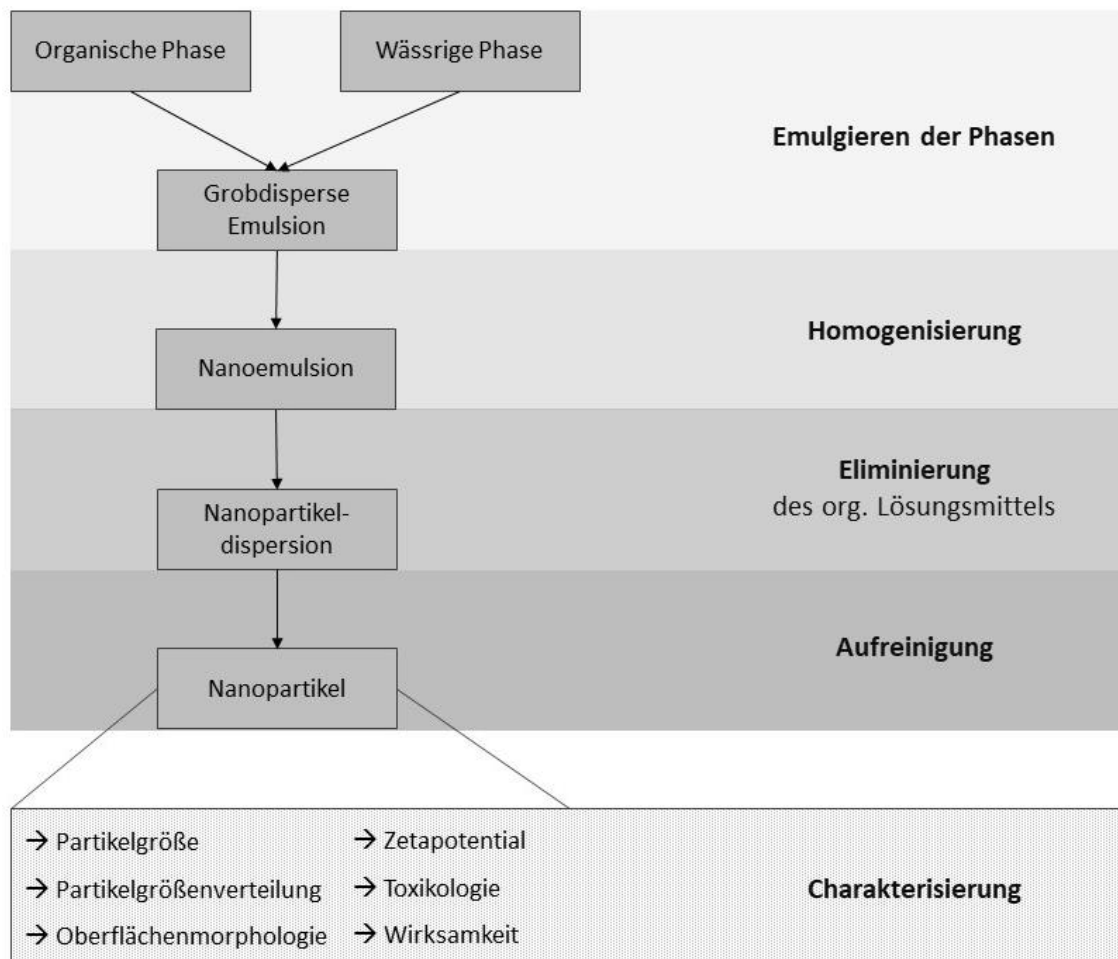
Die erste wissenschaftliche Veröffentlichung zur Herstellung polymerbasierter Nanopartikel ist von Kreuter *et al.* 1978 erschienen [43]. In den folgenden Jahren wurden verschiedene Herstellungsmethoden publiziert, die grundsätzlich in *Bottom-Up*- und *Top-Down*-Verfahren unterteilt werden können und zu monolytischen Nanopartikeln führen [44]. In einem *Bottom-Up*-Verfahren werden Monomere zu nanoskaligen Strukturen polymerisiert. Das Polymer (aus dem die Nanopartikel bestehen) wird also von Grund auf während des Herstellungsprozesses

gebildet. Meist ist dieses Verfahren mit einem größeren Aufwand verbunden, da im Nachhinein Reste des Lösungsmittels und Synthesenebenprodukte entfernt werden müssen [45]. In einem *Top-Down*-Verfahren werden Nanopartikel aus bestehendem Polymer hergestellt. Meistens wird zuerst eine grobdisperse O/W-Emulsion hergestellt, bei der das Polymer in der inneren organischen Phase gelöst vorliegt. Anschließend wird diese Emulsion durch Energieeintrag in eine Nanoemulsion überführt und die organische Phase eliminiert, um solide Nanopartikel zu erhalten [46]. Die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln über ein *Top-Down*-Verfahren lässt sich in vier Schritte unterteilen: Emulgieren, Homogenisieren, Eliminieren des organischen Lösungsmittels und Aufreinigen (Abbildung 1-2) [47, 48].

PLGA-Nanopartikel eignen sich vor allem für lipophile Wirkstoffe als Wirkstoffträger, da lipophile Wirkstoffe durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der PLGA-Matrix gebunden werden können und daher im Gegensatz zu hydrophilen Wirkstoffen oft zu einer höheren Beladungseffizienz führen [49]. Für die Herstellung von PLGA-basierten Nanopartikeln mit lipophilen Substanzen finden sich die ersten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zwischen 1994 von Venier-Julienne *et al.* und 1996 von Lemoine *et al.* [50, 51]. Die Herstellung von monolithischen PLGA-Nanopartikeln basiert seitdem auf den gleichen grundlegenden Herstellungsschritten (Abbildung 1-2).

Im ersten Schritt (Emulgieren) wird PLGA zusammen mit dem lipophilen Wirkstoff in der organischen Phase, bestehend aus Ethylaccetat (EA), Dichlormethan oder anderen mit Wasser nicht oder nur partiell mischbaren organischen Lösungsmitteln gelöst. Die äußere wässrige Phase, die meist einen Stabilisator wie z. B. Polyvinylalkohol (PVA) enthält, wird vorgelegt und die organische Phase emulgiert [52]. PVA ist ein nicht-ionisches synthetisches Polymer und wird aufgrund seiner guten Verträglichkeit und Bioabbaubarkeit in der Medizin, Kosmetik und pharmazeutischen Industrie eingesetzt [53]. Während des Herstellungsprozesses stabilisiert PVA die entstehende Emulsion, indem es sich an die Grenzflächen von organischer und wässriger Phase anreichert und die Grenzflächenspannung vermindert. PVA wird oft bei sehr kleinen Partikeln eingesetzt, da es neben seinem günstigen toxikologischen Profil hervorragende Stabilisierungseigenschaften hat und zu einer engen Partikelgrößenverteilung führen kann [54-56]. Die Auswahl der organischen Phase basiert auf deren Lösungseigenschaft bezogen auf PLGA und den potentiellen Wirkstoff. Für schwer lösliche Wirkstoffe werden daher auch in einigen Fällen Gemische aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln verwendet. Für das Emulsionsverfahren werden mit Wasser nicht mischbare lipophile

Lösungsmittel als innere Phase eingesetzt, da es anderenfalls bereits vor der Homogenisierung zur Präzipitation von PLGA kommen kann. Aufgrund des, im Vergleich zu Dichlormethan, günstigeren toxikologischen Profils wird bevorzugt Ethylacetat als organische Phase eingesetzt [57].



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Herstellungsschritte von wirkstoffbeladenen PLGA-Nanopartikeln nach einem Top-Down-Emulsionsverfahren.** Im ersten Herstellungsschritt (Emulgieren) wird eine grobdisperse O/W-Emulsion erhalten. Im zweiten Herstellungsschritt (Homogenisierung) wird durch Energieeintrag die grobdisperse Emulsion in eine Nanoemulsion überführt. Im dritten Herstellungsschritt (Eliminierung) wird das organische Lösungsmittel aus der inneren Phase eliminiert und die PLGA-Nanopartikel härten aus. Im vierten Herstellungsschritt (Aufreinigung) werden die Nanopartikel gewaschen und getrocknet. Anschließend werden die Nanopartikel physikochemisch und biologisch charakterisiert.

Im zweiten Schritt (Homogenisieren) wird durch Energieeintrag die grobdisperse Emulsion in eine Nanoemulsion überführt. Durch die zugeführte Energie (z. B. in Form von Rührwerkzeugen) muss die Oberflächenspannung der inneren Phase überwunden werden. Dieser Schritt ist entscheidend für die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung, da die Tropfengröße der inneren Phase direkt proportional zur später erhaltenen Partikelgröße ist.

Zwei Hauptfaktoren sind dafür entscheidend. Erstens muss genügend Energie in das System eingebracht werden um die innere Phase gegen die Oberflächenenergie im nanoskaligen Bereich zu dispergieren und zweitens muss die Konzentration des Stabilisators ausreichen, um die innere Phase gegen die Oberflächenenergie zu stabilisieren und ein Zusammenfließen der inneren Phase zu verhindern. Üblicherweise wird hierzu ein Homogenisator eingesetzt, der nach dem Rotor-Stator-Prinzip mit einer hohen Umdrehungszahl arbeitet. Der Energieeintrag über die Umdrehungsgeschwindigkeit und die benötigte Konzentration an Stabilisator in der wässrigen Phase sind dementsprechend umgekehrt proportional zur entstehenden Partikelgröße [58].

Im dritten Schritt (Eliminieren) wird das organische Lösungsmittel entfernt, was zu einer Aushärtung der inneren Phase bzw. des Polymers führt. Bei Präzipitationsmethoden, bei denen mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel (z. B. Aceton) eingesetzt werden, findet dieser Schritt direkt bei der Zugabe des organischen Lösungsmittels in die wässrige Phase statt. Bei Präzipitationsmethoden entfällt daher Schritt zwei und es bilden sich sofort bei der Vermischung beider Phasen Nanopartikel [59]. Bei Emulsionsmethoden wird die organische Phase je nach Dampfdruck und Mischbarkeit mit der wässrigen Phase durch Evaporation oder Diffusion aus der inneren Phase eliminiert. Die Elimination kann entsprechend durch Anlegen eines Vakuums oder durch mehrere Waschschrte forciert werden. Dieser Schritt ist entscheidend für die Partikelgrößenverteilung, da eine auftretende Aggregation der Partikel zu einer breiten Partikelgrößenverteilung führt. Der eingesetzte Stabilisator sollte daher in der Lage sein, auch die ausgehärteten PLGA-Nanopartikel zu stabilisieren [60]. Für den Fall, dass Ethylacetat als organische Phase verwendet wird, findet – bedingt durch den vergleichsweise niedrigen Dampfdruck (76 mmHg) und die Löslichkeit in Wasser (85,3 g/l) – die Elimination über beide Mechanismen (Diffusion und Evaporation) statt [61].

Im vierten und letzten Schritt (Aufreinigung) der PLGA-Nanopartikelherstellung werden Lösungsmittelrückstände und ein großer Teil des Stabilisators entfernt und die PLGA-Nanopartikel lagerungsfähig gemacht. In der Regel werden PLGA-Nanopartikel über Zentrifugation zuerst gewaschen und anschließend gefriergetrocknet [19]. Durch mehrere Waschschrte soll die Verträglichkeit bei späterer Anwendung sichergestellt werden, da Lösungsmittelrückstände oder hohe Stabilisator-Konzentrationen die Biokompatibilität beeinflussen können. Die Gefriertrocknung verläuft in der Regel schonender als andere

Trocknungsverfahren und ist daher auch für thermolabile Wirkstoffe geeignet. Zudem wird die PLGA-Matrix im hydrophilisierten Zustand getrocknet, was eine Benetzung mit Wasser später im Anwendungsfall erleichtern kann. Dieser Schritt ist entscheidend für die Lagerungsfähigkeit der PLGA-Nanopartikel. Eine unzureichende Trocknung kann zur Hydrolyse der PLGA-Matrix während der Lagerung führen und der eingeschlossene Wirkstoff könnte vorzeitig aus den PLGA-Nanopartikeln austreten. Zudem sind nur durch eine ausreichende Trocknung die exakte Masse der PLGA-Nanopartikel und dementsprechend alle Folgeparameter wie Beladungseffizienz, Wirkstoffbeladung und Dosierung zu erfassen.

Während der Herstellung von PLGA-Nanopartikel sollten kritische Parameter, wie Temperatur, Umdrehungszahl der Rührwerkzeuge etc. eng kontrolliert werden. Zudem kann eine umfassende Charakterisierung der hergestellten PLGA-Nanopartikel Abweichungen während des Herstellungsprozesses offenlegen und sollte daher eine Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften, eine Untersuchung der Biokompatibilität und einen Effektivitätscheck des Wirkstoffs einschließen.

### 1.1.3 Physikochemische Charakterisierung von PLGA-Nanopartikeln als Wirkstoffträgersystem

Die Charakterisierung von Nanopartikeln hinsichtlich ihrer physikochemischen Merkmale ist grundlegend und kann Rückschlüsse auf eine Vielzahl von biologischen Eigenschaften wie z. B. Zellaufnahme, Verteilung und toxikologische Aktivität geben [62, 63]. Nur durch entsprechend methodische und analytische Techniken ist eine umfassende Charakterisierung möglich, um den Herstellungsprozess zu optimieren und Rückschlüsse über kritische Eigenschaften der Nanopartikel treffen zu können. Die *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) empfiehlt für die Charakterisierung von Partikeln eine Kombination aus verschiedenen Methoden, um die Schwächen der einzelnen Methoden auszugleichen [64]. Bildgebende Verfahren wie die Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) haben oft den Nachteil, dass dabei nur ein Ausschnitt der hergestellten Nanopartikel untersucht werden kann und dementsprechend eine beispielhafte, aber oft keine statistische Aussage möglich ist. Daher wird meist ergänzend die hydrodynamische Größe von Nanopartikeln mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bzw. Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS vom engl. „*photon correlation spectroscopy*“) bestimmt. Die PCS ermöglicht eine präzise Auswertung der hydrodynamischen Partikelgröße im Bereich von 3 bis 3000 nm, sowie der Partikelgrößenverteilung. Durch die Bestimmung des

hydrodynamischen Durchmessers, können sich Voraussagen über das Verhalten der Partikel in hydratisiertem Zustand treffen lassen [65].

Neben der Größe und der Größenverteilung der hergestellten PLGA-Nanopartikel kann die Beladungseffizienz ein wichtiger Indikator für das Optimierungspotential der Herstellungsmethode sein. Die Beladungseffizienz gibt an, wieviel des eingesetzten Wirkstoffes am Ende der Herstellung in dem Wirkstoffträgersystem vorhanden ist. Der Beladungsgrad gibt das Verhältnis von Wirkstoff zu Gesamtmassenanteil der beladenen PLGA-Nanopartikel an. Während die Beladungseffizienz möglichst hoch sein sollte, kann ein niedriger Beladungsgrad z. B. die Kristallisation des Wirkstoffes während der Lagerung verhindern oder den *Burst Release* in der Freisetzung vermindern [66].

#### 1.1.4 Biokompatibilität von PLGA-Nanopartikeln

Es sind bereits einige Arzneistoffformulierungen, die PLGA als Hilfsstoff enthalten und deren diagnostischer oder therapeutischer Nutzen hauptsächlich durch die physikalischen Eigenschaften erfolgt, von FDA und EMA zugelassen worden. Die Definition der Biokompatibilität als „*die Fähigkeit eines Materials unter bestimmten Gegebenheiten mit der zugehörigen Antwort des Wirts umzugehen*“ [67, 68], wurde von der FDA im Juni 2016 in der entsprechenden Guideline „*Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*“ übernommen. Die DIN EN ISO Norm 10993 stellt die Grundlage zur toxikologischen Beurteilung von Medizinprodukten dar und wird daher auch für Wirkstoffträgersysteme angewendet [69]. Biokompatibilität wird oft einem Material als Eigenschaft zugeordnet und mit dem Begriff nicht-toxisch verwechselt. Da Biokompatibilität allerdings von Wirt und Material abhängt und nur unter bestimmten Bedingungen bzw. für eine spezielle Applikationsroute gegeben ist, handelt es sich bei dem Begriff „biokompatibel“ nicht um eine Eigenschaft des Materials, sondern um einen Zustand, der von vielen Faktoren abhängig ist [70]. Eine Fettemulsion kann zum Beispiel intramuskulär injiziert werden und gut verträglich sein, wird diese jedoch intravaskulär injiziert, kann es zu schweren Embolien kommen. Nur weil ein Material nicht schädlich ist, ist es noch nicht biokompatibel. Nach Williams *et al.* ist streng genommen das eingesetzte Material erst dann als biokompatibel zu bezeichnen, wenn es in positiver Art und Weise mit dem Wirt interagiert, z. B. die Wundheilung fördert oder einen Knochen adäquat ersetzen kann [71, 72].

Vor diesem Hintergrund, ist es wichtig zu verstehen, dass Nanopartikel innerhalb von Sekunden nach der Applikation mit einer Vielzahl von körpereigenen Substanzen wie

Proteinen, Zellen, Phospholipiden, Aminosäuren, Fettsäuren etc. interagieren können. Daher liegt deren Oberfläche praktisch nie frei vor, sondern ist bedeckt von körpereigenen Bestandteilen [73, 74]. Bezieht man sich bei diesen Überlegungen ausschließlich auf Proteine, die vor allem bei systemischer Applikation den größten Teil an Interaktionspartnern stellen, wird von einer Proteinkorona gesprochen [75]. Innerhalb von bereits 30 Sekunden nach intravenöser Gabe kann sich diese auf der Oberfläche der applizierten Nanopartikel bilden [76]. Die Zusammensetzung der Proteine, die auf der Oberfläche adsorbiert werden, ändert sich abhängig von den äußeren Bedingungen und ist als dynamisches System zu verstehen [77]. Zuerst binden Proteine an die Oberfläche der Nanopartikel, die in hohen Konzentrationen vorliegen. Diese werden nach und nach von anderen Proteinen, mit stärkerer Affinität zu der Partikeloberfläche verdrängt (Vroman-Effekt) [78]. Da die Umgebungsbedingungen alternieren können (pH-Wert, mechanische Belastung etc.), kann eine ständige Änderung der Korona die Folge sein [79, 80].

Im Blutkreislauf werden Nanopartikel meist als Fremdkörper erkannt und durch Proteine markiert bzw. opsoniert [81, 82]. Der Komplex aus Nanopartikeln und adsorbierten Proteinen kann von Makrophagen, die Teil des mononuklearen Phagozytensystems (MPS) sind, erkannt werden und führt in der Regel zur Eliminierung der Nanopartikel aus dem Organismus [83, 84]. Je lipophiler die Oberfläche der Nanopartikel, desto anfälliger sind diese gegenüber Proteinbindungen [85]. Die Zellen des MPS exprimieren spezifische Rezeptoren für unterschiedliche Proteinepitope [81]. Daher ist die Reaktion des MPS abhängig von den an der Nanopartikeloberfläche gebundenen Proteinen und kann durch Modifikation der Partikeloberfläche beeinflusst werden [80, 86].

## 1.2 Hilfstoffe

### 1.2.1 Albumin

Humanes Serumalbumin (HSA) macht mit bis zu 5 g auf 100 ml die Hälfte der Proteinmasse und damit den größten Anteil an Proteinen im Blutserum des Menschen aus. Es reguliert den pH-Wert, den osmotischen Druck und dient als Lösungsvermittler für lipophile Nähr- und Wirkstoffe [87]. HSA stellt daher auch den größten Anteil an Interaktionspartnern für niedermolekulare Wirkstoffe und Nanopartikel, die sich im systemischen Kreislauf befinden. Es bindet innerhalb von 30 Sekunden an systemisch applizierte Nanopartikel und stellt den größten Bestandteil der Proteinkorona dar [88]. Die Zusammensetzung der Korona ist



material-, zeit- und ortsabhängig und kann durch die Abschirmung der ursprünglichen Oberfläche die Eigenschaften der Nanopartikel beeinflussen [89, 90]. HSA ist bereits von FDA und EMA als Hilfsstoff in einer nanopartikulären Formulierung für eine systemische Applikation (z. B. als albumingebundenes Paclitaxel; Abraxane®) zugelassen worden [91, 92].

Als Hilfsstoff besitzt HSA neben seiner Bioabbaubarkeit, einer geringen Toxizität und einer geringen Immunogenität, einen protektiven Effekt für Retinol und andere Wirkstoffe und kann daher die Qualität eines Wirkstoffträgersystems vorteilhaft beeinflussen [93-95]. Albumin kann zur Stabilisierung einer O/W-Emulsion beitragen und dadurch bei der Herstellung zu einer kleineren Partikelgröße, sowie zu einer engeren Partikelgrößenverteilung führen. Zudem bietet es als zusätzlicher Bindungspartner das Potential, die Beladungskapazität zu erhöhen [96]. Eine Oberflächenmodifikation der Nanopartikel durch Dysopsonine wie Albumin kann in einer verlängerten Zirkulation der Nanopartikel im Blutkreislauf resultieren [97]. Basierend auf einem erhöhten Zellstoffwechsel in entzündetem Gewebe und dem daraus resultierenden erhöhten Bedarf an Stickstoff, wird Albumin (als Stickstoffquelle) in entzündetem Gewebe meist verstärkt aufgenommen [98]. Unterstützt wird dies durch eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße gegenüber Albumin [99, 100]. Daher könnte sich Albumin vorteilhaft für Wirkstoffträgersysteme mit antientzündlicher Indikation auswirken.

### 1.2.2 Chitosan

Chitosan ist ein lineares Biopolymer und gehört zu den Polysacchariden (Abbildung 1-3). Es kann durch Deacetylierung des Stickstoffs aus Chitin oder direkt aus der Zellwand einiger Pilzarten gewonnen werden, ist bioabbaubar und gilt als kaum toxisch ( $LD_{50}$  bei Mäusen 16 g/kg) [101]. Der Grad der Deacetylierung bestimmt die Anzahl an protonierbaren Aminogruppen des Chitosans und ist somit entscheidend für dessen pH-abhängige Löslichkeit und Ladungsdichte im protonierten Zustand [102]. Es besitzt einen  $pK_s$  von 6,5 und liegt unter physiologischen Bedingungen zum Teil protoniert vor, was zu einer positiven Ladung des Polymers führt [103].

Chitosan eignet sich als Hilfsstoff vor allem für orale Wirkstoffträgersysteme, da es die Verweilzeit im Magendarmtrakt, sowie die Zelladhäsion und Zellpermeabilität erhöhen und dadurch die Bioverfügbarkeit des beladenen Wirkstoffs verbessern kann [104-106]. Positiv geladenes Chitosan kann an Zellmembranen binden und die *tight junctions* durch Interaktion mit den *tight junction*-Proteinen ZO-1 und F-Aktin reversibel destabilisieren. Messbar ist dies durch den verringerten transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER vom engl.

„*transepithelial electrical resistance*“) der Zellen [107]. Abhängig von Molekulargewicht, Konzentration und Grad der Deacetylierung kann Chitosan dadurch den trans- und parazellulären Transport von Wirkstoffen begünstigen [108, 109]. Allerdings steigt mit zunehmendem Grad an Deacetylierung und dadurch bedingter positiver Ladungsdichte auch das toxische Potential von Chitosan gegenüber Caco-2-Zellen. Das optimale Verhältnis zwischen Zelltoxizität und Erhöhung der Zellpermeabilität wurde von Schipper *et al.* bei einer Masse von 170 kDa und 65 % Deacetylierung gefunden [110]. Auch eine erhöhte Wundheilung sowie eine mögliche Inhibition von Matrixmetalloproteinasen durch die Komplexbildung von Schwermetallen wurde für Chitosan berichtet. Allerdings übernimmt Chitosan dabei vermutlich nur eine unterstützende Rolle, da sich die Effekte allein durch Chitosan nicht erklären lassen [103, 111]. Kawashima *et al.* zeigte, dass mit Chitosan modifizierte PLGA-Nanopartikel gegenüber unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln eine höhere Mukoadhäsion an Darmgewebe aufweisen und dadurch zu einem längeren pharmakologischen Effekt führen könnten [112]. Ferner berichteten Tahara *et al.* und Lautenschläger *et al.*, dass PLGA-Nanopartikel deren Oberfläche mit Chitosan modifiziert wurde, eine selektive Adhäsion an entzündetem Darmgewebe zeigten, durch die Mukusschicht drangen und sowohl von Zellen des Darmepithels, als auch von im entzündetem Darmepithel angereicherten Immunzellen aufgenommen wurden [113, 114]. Daher könnte Chitosan die Effektivität von entsprechenden Wirkstoffträgersystemen bei entzündlichen Darmerkrankungen erhöhen.

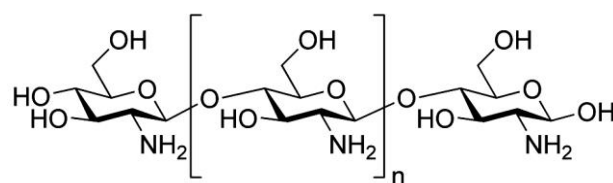


Abbildung 1-3: **Strukturformel von Chitosan (Polyglucosamin), einem linearen Polysaccharid aus  $\beta$ -1,4-D-Glucosamin.** Chitosan liegt meist (abweichend von der gezeigten Strukturformel) nicht vollständig, aber zum Großteil deacetyliert vor.

### 1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Eine Entzündung wird durch das lokale Auftreten von Schmerzen, Temperaturerhöhung, Schwellung, Rötung und eine dadurch bedingte funktionelle Beeinträchtigung charakterisiert. Die meisten Entzündungsreaktionen sind lokal und akut, als Antwort des Immunsystems auf eine Verletzung oder einen eingedrungenen Fremdkörper. In einigen Fällen jedoch chronifiziert sich die Entzündungsreaktion oder nimmt ein lebensbedrohliches Ausmaß an und

muss behandelt werden [115]. Nach aktuellen Schätzungen des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) sind vier Millionen Menschen in Deutschland von chronisch entzündlichen Krankheiten wie z. B. multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa betroffen. Besonders die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) haben durch die steigende Prävalenz und schwierige Therapie an Bedeutung gewonnen. In Deutschland trat 2017 mit 322 Betroffenen je 100 000 Einwohnern die höchste Prävalenz für Morbus Crohn weltweit auf [116]. Für die Behandlung von CED werden Corticosteroide in Kombination mit Immunsuppressiva wie z. B. Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Biopharmazeutika wie Tumornekrosefaktor-Hemmer eingesetzt [117]. Trotz der lokalen Entzündungsherde im Magen-Darm-Trakt werden die Wirkstoffe aus herkömmlichen Arzneimittelformulierungen hauptsächlich systemisch aufgenommen und verlieren bei einer großen Patientengruppe im Laufe der Zeit an Effektivität oder zeigen überhaupt keine Besserung [118, 119]. Da CED nicht heilbar sind, ist eine lebenslange Einnahme von mehreren Arzneimitteln, verbunden mit diversen unerwünschten Arzneimittelwirkungen für die Patienten, oft die Folge. Zusammen mit dem meist schubweisen Verlauf der Krankheit resultiert eine hohe Belastung für die Patienten und aus therapeutischer Sicht eine große Herausforderung [120, 121]. Trotz Motivationsgesprächen, Bereitstellung von Informationen und Medikationswechsel sinkt bei chronisch entzündlichen Erkrankungen oft die Compliance der Patienten und es stellt sich nicht der gewünschte Therapieerfolg ein [122].

### 1.3.1 Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Neutrophile Granulozyten oder als Kurzform „Neutrophile“ genannt, spielen auf zellulärer Ebene eine entscheidende Rolle bei chronischen Entzündungsreaktionen. Neutrophile können eine Reihe von Mediatoren, wie z. B. TNF- $\alpha$ , Prostaglandine (PG), Leukotriene (LT) und Matrixmetalloproteinasen freisetzen, wodurch sich eine Entzündung chronifizieren kann [123]. Im Falle von CED dienen Neutrophile schon lange als Marker für eine bestehende mukosale Entzündungsreaktion [124]. Neutrophile sind unter gesunden Bedingungen jedoch nicht *per se* proinflammatorisch, sie interagieren mit der kommensalen Darmflora und erhalten die mukosale Homöostase zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren aufrecht [125]. Demzufolge führte ein Entfernen von Neutrophilen in der Mukosaschicht des Darms bei verschiedenen Colitis ulcerosa-Modellen zu einer Steigerung der Entzündungssymptome [126]. Daher sollte als therapeutischer Ansatz eine gezielte Medikation erfolgen, die die Funktionalität der Neutrophilen erhält. In diesem

Fall hat es sich bewährt, pro-inflammatorische Schlüsselenzyme der Arachidonsäurekaskade, wie die Cyclooxygenase (COX) -1 und -2 und die 5-Lipoxygenase (5-LOX) (z. B. Zyflo®, in USA zugelassen) zu hemmen [127, 128]. Trotz zahlreicher Studien zu Wirkstoffen, die *in vitro* eine hohe antiinflammatorische Wirkung zeigen, sind in Deutschland als nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) lediglich Wirkstoffe zugelassen, die an der COX-1 und COX-2 angreifen (zugelassene Präparate in Tabelle 1-1) [129].

*Tabelle 1-1 In Deutschland zugelassene nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) bzw. Humanarzneimittel mit Cyclooxygenase-Hemmer (Stand Juni 2019 der ABDA-Datenbank).*

Originalpräparat	Wirkstoff	Angriffspunkt
<b>Salicylsäurederivate</b>		
Aspirin®	Acetylsalicylsäure	Cyclooxygenase-1 und -2
Voltaren®	Diclofenac	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Arylessigsäurederivate</b>		
Beofenac®	Aceclofenac	Cyclooxygenase-1 und -2
Traxam®	Felbinac	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Indolessigsäurederivate</b>		
Tilur®	Acemetacin	Cyclooxygenase-1 und -2
Indophtal®	Indometacin	Cyclooxygenase-1 und -2
Acular®	Ketorolac	Cyclooxygenase-1 und -2
Protaxon®	Proglumetacin	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Arylpropionsäurederivate</b>		
Brufen®	Ibuprofen	Cyclooxygenase-1 und -2
Seractil®	Dexibuprofen	Cyclooxygenase-1 und -2
Spondylon®	Ketoprofen	Cyclooxygenase-1 und -2
Kettesse®	Dexketoprofen	Cyclooxygenase-1 und -2
Apranax®	Naproxen	Cyclooxygenase-1 und -2
Dobendan®	Flurbiprofen	Cyclooxygenase-1 und -2
Surgam®	Tiaprofensäure	Cyclooxygenase-1 und -2
Quadrisol®	Vedaprofen	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Anthranilsäurederivate</b>		
Assan®	Flufenaminsäure	Cyclooxygenase-1 und -2
Ponstan®	Mefenaminsäure	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Oxicame</b>		
Felden®	Piroxicam	Cyclooxygenase-1 und -2
Tilcotil®	Tenoxicam	Cyclooxygenase-1 und -2
Xefo®	Lornoxicam	Cyclooxygenase-1 und -2
Mobicox®	Meloxicam	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Pyrazolidindione</b>		
Ambene®	Phenylbutazon	Cyclooxygenase-1 und -2
Cibalgin®	Propyphenazon	Cyclooxygenase-1 und -2
<b>Coxibe</b>		
Celebrex®	Celecoxib	Cyclooxygenase-2
Arcoxia®	Etoricoxib	Cyclooxygenase-2
Dynastat®	Parecoxib	Cyclooxygenase-2

Um eine umfangreichere Therapie gegen CED und andere chronisch entzündliche Erkrankungen zu ermöglichen, sollten weitere Inhibitoren der Arachidonsäurekaskade, wie z. B. Hemmer der 5-LOX oder der mikrosomalen Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase (mPGES) -1 zum Einsatz kommen [130]. Allerdings eignen sich viele lipophile Wirkstoffe aufgrund einer niedrigen Bioverfügbarkeit oder eines schwierigen toxikologischen Profils nicht für klinische Studien [131]. Ein individuell auf den Wirkstoff zugeschnittenes Wirkstoffträgersystem, das in der Lage ist den Wirkstoff kontrolliert am Zielort freizusetzen ohne dessen Wirkung in unerwünschter Weise zu beeinträchtigen, ist in vielen Fällen die einzige Möglichkeit diese Wirkstoffe nutzbar zu machen [1]. Im Falle von CED könnte eine kontrollierte lokale Freisetzung des Wirkstoffes im Magen-Darm-Trakt die Dosis reduzieren, dadurch bedingt die Verträglichkeit erhöhen und im Endeffekt zu einer besseren Compliance der Patienten führen.

### 1.3.2 Arachidonsäurekaskade

Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäure, die durch enzymatische Oxidation durch Cyclooxygenasen (z. B. COX-1 und -2) oder Lipoxygenasen (z. B. 5-LOX) zu aktiven Entzündungsmediatoren umgesetzt werden kann und daher als Ausgangssubstanz für die Bildung von PG und LT dient (Abbildung 1-4) [132]. Die intrazelluläre Konzentration an Arachidonsäure ist in der Regel sehr gering, da sie vor allem gebunden als Phospholipid in der Kernmembran verschiedener Immunzellen (z. B. in Leukozyten) vorliegt. Erst durch eine Aktivierung dieser Immunzellen, resultierend in einer intrazellulären Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wird durch die aktivierte cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) die Esterbindung zwischen Kernmembran und Arachidonsäure hydrolysiert [133]. Ausschließlich frei im Cytosol vorliegende Arachidonsäure kann weiter metabolisiert werden [134]. Die erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Cytosol der Immunzellen setzt eine Kaskade in Gang, bei der neben der cPLA<sub>2</sub> auch die 5-LOX, COX-1 und -2 aktiviert werden. Durch die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ändern diese Schlüsselenzyme ihre Konformation, in Folge dessen die katalytische Effektivität steigt [135]. Die Metabolisierung von Arachidonsäure über die COX-1 und -2 führt zu der Vorstufe PGH<sub>2</sub>, während die Metabolisierung über die 5-LOX zu der Vorstufe LTA<sub>4</sub> führt [136]. Anschließend können diese Vorstufen durch unterschiedliche Synthesen zu den aktiven Mediatoren umgesetzt werden [137].

Die Metabolisierung von Arachidonsäure über den Cyclooxygenaseweg ist nicht ausschließlich entzündungsbedingt, sondern sichert unter anderem das Gleichgewicht von physiologischen Körperfunktionen, wie z. B. den Blutdruck, die Blutgerinnung und die Körpertemperatur [138].

Die COX-1-Isoform wird konstitutiv exprimiert und sichert eine konstant bleibende Bildung an Prostaglandinen und Thromboxan. Während des Entzündungsgeschehens bleibt die Exprimierung der COX-1 nahezu konstant, während die Genexpression der COX-2 hochreguliert wird [139]. Beide können in einer Zweischnittreaktion die Umsetzung von Arachidonsäure über eine instabile Zwischenstufe (PGG<sub>2</sub>) zu dem Vorstufenprodukt PGH<sub>2</sub> katalysieren. PGH<sub>2</sub> kann durch weitere Prostaglandin-Synthasen bzw. die Thromboxan-Synthase zu aktiven Mediatoren (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> und Thromboxan-A<sub>2</sub>) umgesetzt werden [140]. Neben der COX-2 wird die mPGES-1 während des Entzündungsgeschehens ebenfalls verstärkt exprimiert. Dies verlagert das Gleichgewicht in Richtung einer PGE<sub>2</sub>-Metabolisierung [141]. Eine erhöhte Exkretion von PGE<sub>2</sub> führt unter anderem zu einer Sensibilisierung von Nozizeptoren, erhöhter Temperatur und Krebszellproliferation [142]. Im Falle von CED kann eine erhöhte Exprimierung der mPGES-1 und die daraus erhöhte Konzentration an PGE<sub>2</sub> in entzündetem Darmgewebe zu einem entzündlichen Schub führen und auch die Entstehung eines Kolonkarzinoms fördern [143, 144].

Die 5-LOX spielt bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen eine zentrale Rolle, wie z. B. bronchialem Asthma, rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis und allergischer Rhinitis [145]. Arachidonsäure kann über die 5-LOX zu LTA<sub>4</sub> umgesetzt werden, welches anschließend durch die LTA<sub>4</sub>-Hydrolase zu LTB<sub>4</sub> oder durch die LTC<sub>4</sub>-Synthase in Verbindung mit Glutathion zu Cysteinyl-Leukotrien-1 (CysLT<sub>1</sub>) oder -2 (CysLT<sub>2</sub>) umgesetzt wird [129]. LTB<sub>4</sub>, CysLT<sub>1</sub> und CysLT<sub>2</sub> fungieren als aktive Entzündungsmediatoren und können durch Anlocken von Neutrophilen und Erhöhung der Gefäßpermeabilität eine Migration von Immunzellen in das entzündete Gewebe bedingen, was im Endeffekt zu der Aufrechterhaltung der Entzündung führt [146].

Ferner gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass die Arachidonsäurekaskade bzw. Schlüsselenzyme wie die COX-1, COX-2 und die 5-LOX, neben der Beteiligung am Entzündungsgeschehen auch eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Krebs spielen [147, 148]. Durch pro-inflammatorische Zellen, Entzündungsmediatoren und nekrotische Zellen kann sich im chronisch entzündeten Gewebe eine Mikroumgebung bilden, die die Entstehung von Tumorerkrankungen fördern kann [149]. Dementsprechend ist das Risiko für Darmkrebs bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht [150].

In der Therapie von entzündlichen Erkrankungen stehen daher, neben Immunsuppressiva, Schlüsselenzyme wie die COX-2, mPGES-1 und 5-LOX im Fokus. Die meisten NSAR greifen unspezifisch an beiden Isoformen der COX oder spezifisch an der COX-2 Isoform an und wirken dadurch analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch. Allerdings haben aktuelle Studien gezeigt, dass im Falle von CED eine spezifische Hemmung der PGE<sub>2</sub> einer unspezifischen Hemmung der Cyclooxygenasen überlegen sein könnte [143, 151]. Eine duale Hemmung der 5-LOX und der mPGE-1 wird als überlegene Strategie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen diskutiert [152, 153].

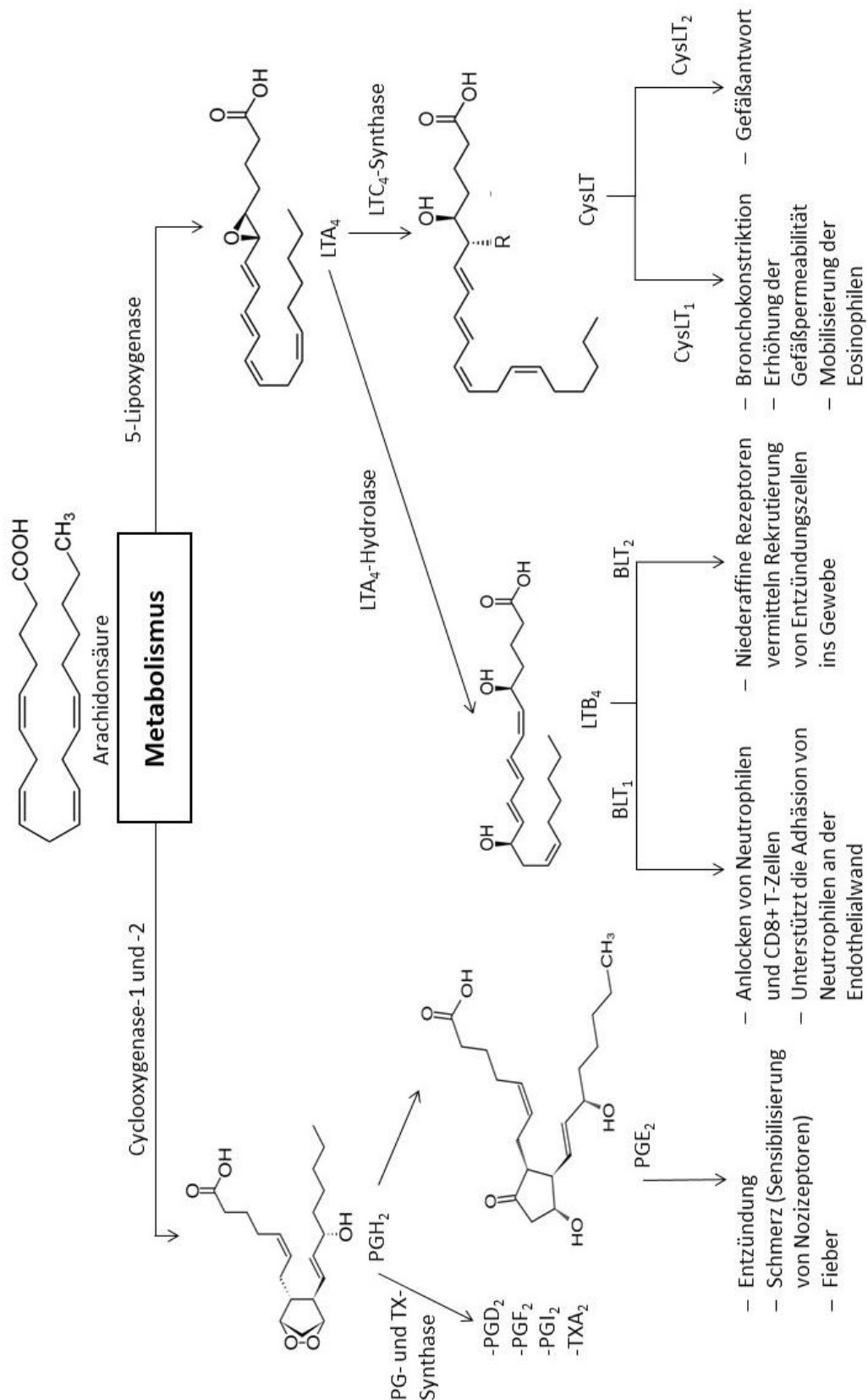


Abbildung 1-4: **Arachidonsäurekaskade.** Metabolisierungswege der freien Arachidonsäure über die Schlüsselenzyme Cyclooxygenase (COX) -1 und -2 und über die 5-Lipoxygenase (5-LOX). Die Effekte, die durch den jeweiligen Mediator bzw. durch den Angriff an den spezifischen Rezeptor ausgelöst werden, sind jeweils darunter zusammengefasst.



## 1.4 Innovative lipophile Wirkstoffe zur antiinflammatorischen Therapie

### 1.4.1 Embelin

Embelin (2,5-Dihydroxy-3-undecyl-1,4-benzochinon) ist ein natürlich vorkommendes 1,4-Benzoquinon und stellt den pharmakologisch wirksamen Bestandteil des Extraktes aus *Embelia ribes* (*Primulaceae*) dar. Embelin besteht aus einem 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinon mit einem n-Undecylrest, resultierend in zwei konjugierten Carbonsäureeinheiten (Abbildung 1-5). Unter physiologischen Bedingungen liegt der lipophile Naturstoff als einfach und zweifach deprotoniertes Anion vor und bindet im Blutkreislauf an Plasmaproteine wie HSA [154, 155]. Embelin kann durch saure Hydrolyse, erhöhte Temperatur und oxidativen Stress an der 5-Hydroxygruppe zum entsprechenden Methylether abgebaut werden [156].

Embelin zeigte in mehreren Studien *in vivo* aufgrund seiner Interaktion mit verschiedenen onkogenen Transkriptionsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteinkinasen sowohl eine antiinflammatorische als auch eine antiproliferative bzw. antikanzerogene Wirkung [157-159]. Neben der direkten Hemmung von Zielstrukturen wie dem *X-chromosome-linked inhibitor-of-apoptosis protein* (XIAP), steigert Embelin durch seine umfangreiche Hemmung diverser Signalwege auch die Effektivität anderer Krebstherapeutika [160]. Für die entzündungshemmenden Eigenschaften von Embelin sind vermutlich neben einer verminderten Bildung des Tumor Nekrose Faktors (TNF)- $\alpha$ , verschiedenen Interleukinen (IL) und Stickstoffmonoxid (NO) und einer gehemmten Expression der Cyclooxygenase-2, vor allem die Hemmung der 5-LOX und der mPGES-1 ausschlaggebend [161]. Embelin zeigte eine  $IC_{50}$  (inhibitorische Konzentration bei 50 % Hemmwirkung) von 0,09  $\mu$ M bei der 5-LOX und eine  $IC_{50}$  von 0,2  $\mu$ M bei der mPGES-1 (gemessen am freien Enzym) [161]. Bei anderen Zielstrukturen tritt in der Regel eine relevante Hemmung durch Embelin (*in vitro*) erst ab einer Konzentration von mehr als 4  $\mu$ M ( $IC_{50}$ ) auf. Damit liegen die  $IC_{50}$ -Werte von Embelin für die 5-LOX und mPGES-1 um mehr als eine Zehnerpotenz unterhalb der entsprechenden Konzentration für andere Zielstrukturen. Zudem liegt die  $IC_{50}$  für eine 5-LOX-Hemmung vermutlich unter der, des bis heute einzigen zugelassenen 5-LOX-Hemmers (Zileuton mit einer  $IC_{50}$  von 0,6  $\mu$ M) [162]. Embelin greift selektiv, reversibel und nicht kompetitiv an der 5-LOX an und kann dadurch die Umsetzung von Arachidonsäure in die aktiven Leukotrien-Mediatoren hemmen [163]. Zur 5-LOX verwandte Enzyme (z B. 12-LOX und 15-LOX) oder in der Arachidonsäurekaskade

übergeordnete Enzyme (z. B. COX-1 bzw. -2 und CPLA<sub>2</sub>) werden lt. Koeberle *et al.* nicht gehemmt [164].

Neben einem potenten entzündungshemmenden Profil zeigt Embelin eine gute Verträglichkeit und niedrige Toxizität. Die orale Gabe über mehrere Wochen von 10 mg/kg bei Nagetieren führte in unterschiedlichen Studien zu keinerlei toxischen Reaktionen [165-167]. Embelin wird in die Klasse II des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS vom engl. „*Biopharmaceutics Classification System*“) eingestuft (Kapitel 1.6) und zeigte aufgrund seiner geringen Löslichkeit (3 µg/ml oder 10 mM; lt. Ph. Eur. V. 9.0 „praktisch unlöslich“) bei einer oralen Gabe von 70 mg/kg pro Tag bei Mäusen lediglich eine maximale Plasmakonzentration von 3,6 µg/ml. Diese fiel bereits nach einer Stunde rapide ab [168, 169]. Die orale Gabe von Embelin findet meist in Form von Tabletten oder einer Emulsion statt und kann zur unspezifischen Akkumulation in Niere, Leber, Milz, Herz und Gehirn führen [160, 170]. Trotz seiner vielversprechenden biologischen Aktivität führte der Einsatz von Embelin bisher nicht zum erwünschten Erfolg in klinischen Studien [171, 172].

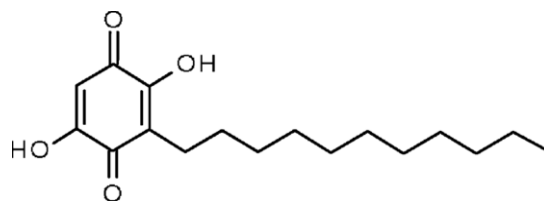


Abbildung 1-5: **Strukturformel von Embelin (IUPAC: 2,5-Dihydroxy-3-Undecylcyclohexa-2,5-dien-1,4-dion), molare Masse = 294 g/mol.**

#### 1.4.2 Retinol

Retinol bzw. Vitamin A<sub>1</sub> ist Bestandteil von Vitamin A und zählt zu den fettlöslichen Vitaminen. Retinol kommt in einer Vielzahl von Lebensmitteln vor und wird *in vivo* schnell zu seinen Metaboliten (Retinol-Ester, Retinal oder Retinsäure) verstoffwechselt (Abbildung 1-6). Der lipophile Naturstoff ist durch äußere Einflüsse, wie Temperatur oder Sauerstoff, sehr oxidationsanfällig und eignet sich daher gut als chemisch anfällige Modellschubstanz [173]. Retinol und seine Metaboliten können ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren aktivieren oder durch Regulierung der Signalwege abhängig vom Phosphorylierungsstatus der Zielstruktur eine Vielzahl an biologischen Prozessen wie Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung, sowie die Homöostase in der embryonalen Entwicklung und der Organogenese steuern [174, 175]. Zudem wurde in vielen Studien ein antientzündliches Potential bei Erkrankungen wie Psoriasis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, systemischen Autoimmunerkrankungen und Fettleibigkeit erkannt [176, 177].

So facettenreich das Wirkungsspektrum von Retinoiden ist, so vielfältig ist auch das toxische Potential. Wird die empfohlene Tagesdosis von 800 µg (lt. EU-Richtlinie 2008/100/EG) überschritten, können unspezifische Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen oder Diarrhö, auftreten [178]. Bei höheren Dosen oder einer chronischen Überdosierung können Leberschäden oder kognitive Störungen auftreten [174]. Die Indikation von derzeit zugelassenen Präparaten ist auf die Behandlung von Vitamin A-Mangelzuständen und Haut- bzw. Schleimhauterkrankungen beschränkt (Stand: Juni 2019 aus der Arzneimittel-Fachinformation). Der kritische Umgang mit Vitamin A-Präparaten basiert vermutlich auf dem schwierigen Nutzen-Risiko-Profil, was sich aus der Affinität zu multiplen Zielstrukturen und der Tatsache ableiten lässt, dass aufgrund der chemischen Anfälligkeit ein Substanzgemisch vorliegt [179, 180]. Die maximale Tagesdosis von 0,8 mg fällt im Vergleich zu herkömmlichen NSAIDs, wie Acetylsalicylsäure (maximale Tagesdosis: 3000 mg) oder Ibuprofen (maximale Tagesdosis: 2400 mg), vergleichsweise gering aus und die Vielzahl an möglichen Zielstrukturen erschwert die pharmakologische Charakterisierung. Ferner führt die chemische Instabilität des lipophilen Naturstoffes zu einem aufwendigeren Formulierungsprozess verglichen zu chemisch stabilen Wirkstoffen.

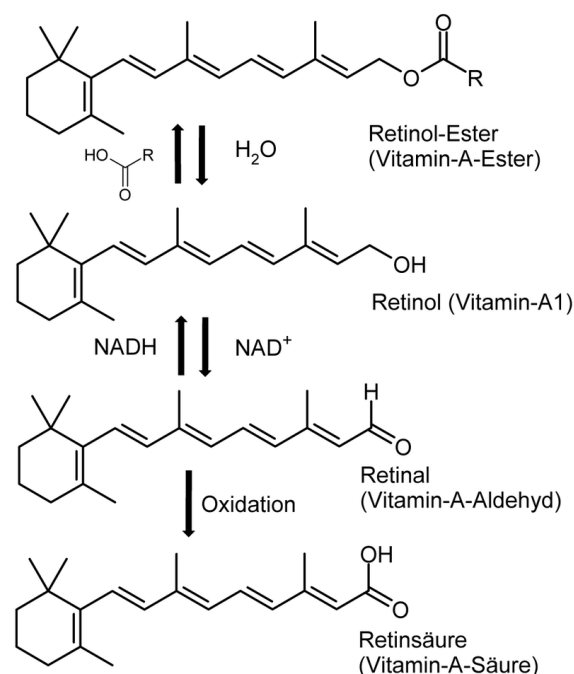


Abbildung 1-6: **Strukturformel von Retinol (IUPAC: (2E, 4E, 6E, 8E)-3, 7-Dimethyl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2, 4, 6, 8-tetraen-1-ol)), Retinol-Ester, Retinal und Retinsäure.** Die molare Masse von Retinol beträgt 286 g/mol.

Retinol ist nach der Einstufung des Ph. Eur. V. 9.0 praktisch unlöslich in Wasser (17 µg/l oder 0,06 µM) und wird daher meist als ölige Lösung oder Emulsion verabreicht [173, 181]. Um Retinol als Wirkstoff für entzündliche Erkrankungen nutzbar zu machen, sind die bisher üblichen Darreichungsformen ungeeignet. Es bedarf eines effizienten *Drug Delivery Systems*, das nicht nur in der Lage ist Retinol gegen äußere Einflüsse zu schützen, sondern kontrolliert an der betreffenden Zielstruktur über mehrere Stunden freizusetzen ohne dessen Wirksamkeit einzuschränken.

### 1.5 Hühnerei-Test an der Chick-Area-Vasculosa (HET-CAV) als *ex ovo*-Modell zur Bewertung von toxikologischen Profilen

Bei der sachgemäßen Anwendung von Arzneimitteln muss der Hersteller gemäß § 1 des Arzneimittelgesetzes (AMG) die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels gewährleisten. Um die Unbedenklichkeit eines Arzneimittels zu gewährleisten ist ein toxikologisches Profil des jeweiligen Arzneimittels schon während der Entwicklung zu erstellen. Zellbasierte Versuche sind zumeist der erste Schritt bei der Entwicklung eines neuen Wirkstoffs oder Wirkstoffträgersystems. Auf der einen Seite können diese im Falle von nanopartikulären Formulierungen oft nicht die Komplexität eines lebenden Organismus wiedergeben, auf der anderen Seite werden Tierversuche heutzutage nur noch unter strengen Auflagen genehmigt. Das Deutsche Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften (DRZE) wurde 1999 als Projekt des BMBF gegründet, um sich u. a. mit dem Thema „Tierversuche in der Forschung“ hinsichtlich ethischer Gesichtspunkte zu befassen. Daraufhin entstand unter anderem der Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM), der seit 2010 von der Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) als Alternativmethode zum Draize-Test, einem Tierversuch der am Kaninchenauge durchgeführt wird, empfohlen wird. Der Draize-Test wird seit 1944 angewendet um das Hautreizungspotential von Chemikalien zu ermitteln. Dabei wird die zu prüfende Substanz meist in den Lidsack des Kaninchenauges gegeben und das Reizungspotential aufgrund folgender Reaktionen ermittelt: Rötung, Schwellung, Ausfluss, Ulzeration, Hämorrhagie, Trübung und Erblindung [182]. In Deutschland ersetzt der HET-CAM den Draize-Test allerdings nur bei schwer reizenden Chemikalien. Der HET-CAM wird am zehnten Bebrütungstag nach dem Methodenprotokoll des ICCVAM, welches sich an den Publikationen von Luepke *et al.* 1985, Balls *et al.* 1995, Gilleron *et al.* 1996 und Spielmann *et*

al. 1996 orientierte, an befruchteten Eiern von weißen *Leghorns* (Hühnerrasse) durchgeführt [183-186].

Die Entwicklung von Hühnereiern ist seit über 20 Jahren sehr gut erforscht. V. Hamburger und H. L. Hamilton teilten die Entwicklung des Hühnereis in 46 Stadien ein (HH-Stadien) [187]. Die Chorion-Allantoin-Membran bildet sich nach etwa 4 Tagen (22. HH-Stadium) als Verschmelzung des Chorion- mit dem Allantoin-Mesoderm (beides Bestandteile der Embryofruchthülle) und vaskularisiert in den Folgetagen. Sie legt sich um den Embryo, sorgt für die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen (z. B. Calcium aus der Eischale) und spielt beim Knochenwachstum eine wichtige Rolle. Der klassische HET-CAM wird nach Tag 10 (36. HH-Stadium) der Bebrütung durchgeführt. Ein kleiner Teil der Schale wird entfernt, die zu untersuchende Substanz wird aufgetragen, die lokale Reaktion der Schleimhaut über 5 min untersucht und nach einer Wertungstabelle kategorisiert (Maximalwert von 21). Ab einem Wert von 9 gilt eine Substanz als schwer reizend, in Deutschland kann in diesem Fall der Draize-Test entfallen [188, 189]. Für die Beurteilung wird allerdings nur ein lokal stark begrenzter Abschnitt des Hühnereis bewertet.

Der HET-CAV ist zwar an den HET-CAM angelehnt, kann jedoch in einem früheren Entwicklungsstadium *ex ovo* stattfinden und bietet dadurch die Möglichkeit, das komplette Gefäßsystem zu beurteilen. Die *Chick-Area-Vasculosa* ist ebenfalls ein Blutgefäßsystem des Hühnereis, entwickelt sich bereits nach etwa 24 h (HH-Stadium 7) aus der inneren Eihaut und wird ab Tag 6 von der CAM überwuchert [190]. Da die CAV ab Tag 6 der Bebrütung mit der CAM verwächst, findet der HET-CAV meist an Tag 3 – 5 der Bebrütung (HH-Stadium 20 – 27) statt. Durch die *ex ovo*-Durchführung steht eine große Beprobungsfläche zur Verfügung, eine einfache Applikation der Proben ist möglich, die Entwicklung des Hühnereis, sowie das gesamte Blutgefäßsystem sind sichtbar und die Auswertung farbiger bzw. intransparenter Proben ist möglich. Während der HET-CAM lediglich die Auswertung über Gefäßlyse, Hämorrhagie und Koagulation zulässt, können mit Hilfe des schalenlosen HET-CAV zusätzlich Hämolyse und der Stillstand des Herzens beobachtet werden. Ferner ist das Schmerzempfinden aufgrund des frühen Entwicklungsstadiums des Hühnereis noch nicht ausgebildet. Dieses ist erst nach Zusammenschluss der multisynaptischen Reflexbögen vorhanden, was nicht vor dem 6. Bebrütungstag erfolgt (HH-Stadium 29) [191]. Vor dem Hintergrund, dass der HET-CAM am 10. Bebrütungstag durchgeführt wird, ist, neben den oben genannten Vorteilen, der HET-CAV auch hinsichtlich ethischer Aspekte dem HET-CAM zu

bevorzugen [192]. Ferner ist durch die relativ kurze Bebrütungszeit und dem damit geringeren Arbeits- und Platzaufwand der HET-CAV im Vergleich zum HET-CAM günstiger und ermöglicht eine höhere Durchsatzrate an Versuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit fand der HET-CAV Anwendung, um unbeladene und mit Wirkstoff beladene PLGA-Nanopartikel mit einem ungünstigen toxikologischen Profil frühzeitig zu identifizieren und auszuschließen. Nach § 7a des Tierschutzgesetzes (TierSchG) handelt es sich dabei nicht um einen Tierversuch und folgt dem 3R-Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement). Das 3R-Prinzip, in deutscher Sprache 3V-Prinzip (Vermeidung, Verringerung, Verfeinerung), entspricht den Vorgaben gemäß § 7 II des TierSchG und Art. 7 II und III der EU-Richtlinie 86/609/EWG und wurde 1959 in dem Buch „*The Principles of Humane Experimental Technique*“ von William Russel und Rex Burch vorgestellt. Unter dem Begriff Vermeidung wird das Ersetzen eines Tierversuchs durch z. B. Zellversuche oder Computersimulationen verstanden. Eine Verringerung der Anzahl an Tierversuchen kann vor allem durch eine ausgefeilte Versuchsplanung und entsprechende statistische Auswertungen erreicht werden. Durch Verfeinerung der Tierversuche soll das Leiden der Versuchstiere so gering wie möglich ausfallen.

Vor allem bei der Charakterisierung von Nanopartikeln können alternative Testsysteme wie der HET-CAV sinnvoll sein, da Nanopartikel einzigartige Eigenschaften besitzen, die durch zellbasierte Versuche möglicherweise nicht vollständig erfasst werden können [193]. Nanopartikel stehen aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaften in der Öffentlichkeit nach wie vor in dem Verdacht *per se* schädlich zu sein. Dabei wird oft nicht zwischen den verschiedenen Nanopartikelarten differenziert [194]. Ferner spielen sogenannte „*no-effect*“-Studien die keine toxischen Effekte der Nanopartikel zeigen, in der Literatur kaum eine Rolle [194]. Trotz der Gemeinsamkeit einer großen volumenbezogenen Oberfläche muss zwischen den verschiedenen Nanomaterialien streng differenziert werden. Nicht alle Materialien, die eine große volumenbezogene Oberfläche aufweisen, haben ein hohes toxisches Potential und umgekehrt. Daher sollten Nanopartikel umfassend charakterisiert werden, und bei der Erstellung eines toxikologischen Profils besonderer Wert auf die einzigartigen physikochemischen Eigenschaften gelegt werden, die durch reine Zellversuche nicht immer abgedeckt werden können [193].

## 1.6 Wirkstofffreisetzung und -abtransport innerhalb des Caco-2-Modells

Um die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen einzuschätzen wurde das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS) im Jahr 1995 etabliert [195]. Durch das BCS werden Wirkstoffe aufgrund ihrer Löslichkeit und Permeabilität in vier Klassen eingestuft (Abbildung 1-7).

Klasse	Löslichkeit	Permeabilität
1	Hoch	Hoch
2	Niedrig	Hoch
3	Hoch	Niedrig
4	Niedrig	Niedrig

Abbildung 1-7: Das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (BCS) nach Amidon et al. [196].

Basierend auf der Definition des „Center for Drug Evaluation and Research“ der FDA, wird in der Richtlinie für die Industrie: *“Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System”*, die im Dezember 2017 aktualisiert wurde, die Löslichkeit eines Arzneistoffes als „hoch“ eingestuft, wenn der Arzneistoff in seiner höchsten Einzeldosis in 250 ml oder weniger in wässrigem Medium über einen pH-Bereich von 1 bis 6,8 bei 37 °C löslich ist. Ferner wird die Permeabilität eines Arzneistoffes als hoch eingestuft, wenn die verabreichte Dosis, im Vergleich zu einer intravenösen Gabe, mindestens 85 % (m/m) der systemischen Bioverfügbarkeit beträgt. Die Leitlinie des *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) „Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers M9“, die im Juni 2018 aktualisiert wurde, empfiehlt, für *in vitro*-Versuche zur Einschätzung der Permeabilität von Arzneistoffen einen Caco-2-Zellmonolayer als Goldstandard zu verwenden. Im Falle von Generika einer schnellfreisetzen, oralen und festen Formulierung können unter bestimmten Voraussetzungen *in vivo*-Studien zur Bioäquivalenz durch das Caco-2-Modell ersetzt werden [197]. Im Annex I wird aufgrund der möglichen morphologischen Änderungen der Caco-2-Zellen bezüglich ihres enzymatischen Profils empfohlen, diese nur zur Beurteilung des passiven Arzneistofftransports zu nutzen. Ferner wird empfohlen, die Integrität des Caco-2-Zellmonolayers über den TEER zu verifizieren.

Caco-2-Zellmonolayer werden seit über 30 Jahren aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu Zellen des Dünndarmepithels als Modell für die intestinale Barriere für Transportstudien am Darm eingesetzt [198]. Caco-2-Zellen stammen ursprünglich aus einem kolorektalen Adenokarzinom und wurden aufgrund ihrer Fähigkeit spontan zu differenzieren, als Zelllinie etabliert [199]. Es handelt sich um adhärente Zellen, die bei Konfluenz spontan in eine polare Morphologie mit einer apikal lokalisierten Bürstensaummembran inklusive Mikrovilli differenzieren, ein typisches Merkmal des Dünndarmepithels [197]. Ferner bilden Caco-2-Zellen nach 21 Tagen der Kultivierung interzelluläre Membranproteinbänder (*tight junctions*) aus und sind somit in der Lage, einen intakten Monolayer auszubilden [200]. Basierend darauf lässt sich mit Hilfe des Caco-2-Modells für viele Arzneistoffe das Permeationsverhalten unter physiologischen Bedingungen im Dünndarm einschätzen [201]. Die Vergleichbarkeit von Zellversuchen aus unterschiedlichen wissenschaftlichen Studien gestaltet sich nach wie vor durch die Diversität des Versuchsdesign oft schwierig [202, 203]. Um die Qualität und Vergleichbarkeit mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten zu dem verwendeten Caco-2-Modell zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit standardisierte Caco-2-Zellen vom Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) verwendet. Ferner wurde die Vorgehensweise für die Kultivierung des Caco-2-Zellmonolayers nach einem Protokoll von Hubatsch *et al.* kultiviert, welches sich an Vorgaben des ICH und der FDA anlehnt und bereits über 600 mal zitiert wurde [204].



## 1.7 Zielstellung

Die Entdeckung innovativer Naturstoffe mit antiinflammatorischen Eigenschaften ist nach wie vor Gegenstand innovativer pharmazeutischer Forschung. Vor allem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ist der Bedarf an neuen Therapieoptionen hoch. Allerdings kann aufgrund von nachteiligen Eigenschaften einiger Naturstoffe, wie z. B. niedriger Löslichkeit in Wasser oder physikochemischer Instabilität, das Potential dieser neu entdeckten Wirkstoffe oft nicht nutzbar gemacht werden.

Im Fokus dieser Arbeit stand daher die Entwicklung eines Wirkstoffträgersystems für lipophile antiinflammatorische Naturstoffe mit geringer Löslichkeit in Wasser und/oder physikochemischer Instabilität. Dazu sollte eine neue Herstellungsmethode für PLGA-Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Partikelgröße im Größenbereich von 200 nm und enger Partikelgrößenverteilung entwickelt werden, mit der auch physikochemisch instabile Wirkstoffe beladen werden können. Die Herstellung der PLGA-Nanopartikel sollte zudem unter Verwendung verschiedener Hilfsstoffe modifiziert werden, um den Einfluss verschiedener Partikeloberflächen hinsichtlich Freisetzung und Toxizität untersuchen zu können. Die hergestellten PLGA-Nanopartikel sollten zunächst physikochemisch bezüglich Größe, Größenverteilung, Zetapotential und Beladungsgrad charakterisiert werden. Anschließend sollten die Nanopartikel biologisch, unter besonderer Berücksichtigung der Biokompatibilität im Rahmen der Nanosicherheit, bezüglich Zytotoxizität, Bluttoxizität und Freisetzungsverhalten untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte ein schalenloses Hühnereimodell für lipophile Wirkstoffe und nanopartikuläre Trägersysteme optimiert werden, und ein toxikologisches Profil der beladenen Wirkstoffträgersysteme unter dynamischem Blutfluss erstellt werden. Ferner sollte das Freisetzungsverhalten der beladenen Nanopartikel hinsichtlich einer möglichen Anwendung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen an der Darmbarriere untersucht werden. Angestrebt wurde eine luminale und möglichst vollständige Freisetzung innerhalb von 12 Stunden.

Als entzündungshemmende Wirkstoffe standen Embelin und Retinol zur Verfügung. Embelin eignet sich durch seine vielfältigen und hochpotenten antiinflammatorischen Eigenschaften als Modelsubstanz für lipophile Naturstoffe mit geringer Löslichkeit in Wasser. Retinol wurde aufgrund seiner chemischen Instabilität beispielhaft für lipophile, physikochemisch anfällige Naturstoffe eingesetzt, um basierend darauf die Herstellungsmethode hinsichtlich der Beladungseffizienz zu optimieren.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Herstellung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikeln

Die verwendeten Nanopartikel wurden mittels modifiziertem Emulsions-Verfahren, basierend auf dem Verfahren von Kumar *et al.* hergestellt [205]. Die hergestellten Nanopartikel wurden als *Drug Delivery System* für die lipophilen Wirkstoffe Retinol (Hädener Rohstoffe GmbH, St. Gallen, Schweiz) und Embelin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) genutzt und im Rahmen der Herstellung teilweise mit humanem Serumalbumin (HSA) (Fraktion V, Carl Roth GmbH) oder Chitosan (400 000 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) modifiziert. Die organische Phase enthielt 5 mg Retinol oder Embelin und 50 mg PLGA (7 000 – 17 000 g/mol) (50:50, Resomer® RG 502, Evonik, Essen, Deutschland), die in 5 ml Ethylacetat ( $\geq 99.5\%$ , p.a.) (Carl Roth GmbH) gelöst wurden.

Bei der Herstellung der PLGA-Nanopartikel bestand die wässrige Phase aus deionisiertem Wasser mit 2 % (m/V) Polyvinylalkohol (PVA) (30 000 – 70 000 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) als Stabilisator. Für die Herstellung der 2 % (m/V) PVA-Lösung wurden 20 g PVA in einem Liter deionisiertem Wasser über 4 h unter Rühren bei 80 °C gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und durch einen Celluloseacetatfilter (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einer Porenweite von 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,1 N Salzsäure oder 0,1 N Natronlauge auf 7,4 eingestellt. Die organische Phase wurde durch ein neMESYS-Pumpsystem (CETONI GmbH, Korbußen, Deutschland) der wässrigen Phase zugeführt (10 ml/min) und für 2 h mit 400 Umdrehungen pro Minute (UPM) gerührt. Die entstandene O/W-Emulsion wurde mittels Ultra-Turrax T25 (IKA-Werke, Staufen, Deutschland) für 15 min bei 24 000 UPM homogenisiert. Anschließend wurden 50 ml deionisiertes Wasser unter ständigem Rühren (300 UPM) hinzugegeben, um die Diffusion und Evaporation des Ethylacetats aus der inneren Phase zu begünstigen und die Nanopartikel aushärten zu lassen. Um die Herstellung der Nanopartikel unter Ausschluss von Luftsauerstoff und Licht (ALL) durchzuführen, wurde die Herstellung in einem aus Edelstahl gefertigtem Gehäuse (2 x 1 x 1 m) mit Stickstoffzufuhr und zwei Öffnungen für den Zugriff von außen, durchgeführt. Für die Herstellung wurde der Innenraum zuerst mit Stickstoff gesättigt und anschließend unter ständiger Stickstoffzufuhr gearbeitet. Alle Partikel ohne die Bezeichnung „ALL“ wurden in Anwesenheit von Luftsauerstoff und Licht hergestellt.

### 2.1.1 Aufreinigung von PLGA-Nanopartikeln

Direkt nach dem Herstellungsprozess wurden die Nanopartikel durch mehrere Waschschr tte mittels Zentrifugation (Beckman Allegra 64R, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) von Rückständen des organischen Lösungsmittels gereinigt. Die Nanopartikel wurden dafür 20 min bei 22 000 g zentrifugiert und zweimal mit jeweils 50 ml deionisiertem Wasser gewaschen.

Für die Methodenentwicklung in Kapitel 3.1.2.2 wurden die hergestellten Nanopartikel nach der Aufreinigung zusätzlich durch einen Celluloseacetatfilter (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit einem Porendurchmesser von 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Der Filter wurde vor der Filtration mit 2 ml deionisiertem Wasser benetzt und nach der Filtration mit 2 ml deionisiertem Wasser gespült.

### 2.1.2 Gefriertrocknung der beladenen und unbeladenen PLGA-Nanopartikel

Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden die durch Zentrifugation aufkonzentrierten Nanopartikel direkt in den 50-ml Probengefäßen mit flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  schockgefrostet und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Die eingefrorenen Nanopartikeldispersionen wurden in einen Gefriertrockner (ModulyoD Freeze Dryer, Thermo Fisher Scientific Inc., Braunschweig; Deutschland)  berf hrt und bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 0,01 bar für 72 h gefriergetrocknet, um sie anschließend quantifizieren und charakterisieren zu können. Der Gefriertrockner wurde auf  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt und die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefrorene PLGA-Nanopartikeldispersion in der Gefriertrocknungskammer platziert. Der Druck wurde von 1 bar auf 0,01 bar innerhalb von 3 h verringert und für weitere 65 h gehalten. Als Nachtrocknungsprozess wurde die Temperatur, nach Abschluss der Haupttrocknungsphase, innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur angepasst und anschließend der Druck innerhalb von 3 h wieder auf Normaldruck erhöht.

## 2.2 Physikochemische Charakterisierung von PLGA-Nanopartikel

### 2.2.1 Vermessung mit Lichtstreutechniken

Die Nanopartikel wurden in deionisiertem Wasser dispergiert und mittels dynamischer Lichtstreuung mit einem Photonenkorrelationsspektrometer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) in Einmalküvetten (half micro Rotilabo<sup>®</sup>, BRAND, Wertheim, Deutschland) vermessen und der hydrodynamischen Durchmesser (HD), sowie der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 633 nm, bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in einem Winkel von  $173^{\circ}$  und mit einem Brechungsindex von 1,33. Das

Zetapotential (ZP) wurde durch die elektrophoretische Mobilität der Nanopartikel mittels Laser-Doppler-Anemometrie ebenfalls bei 25 °C in DTS1060 Kapillarküvetten (Malvern Instruments) bestimmt. Die Berechnung des HD, PDI und ZP wurde unter Verwendung der Gerätesoftware Zetasizer V. 7.11 durchgeführt.

### 2.2.2 Elektronenmikroskopie

Um die Nanopartikel mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu charakterisieren, wurden 4 µl einer Nanopartikeldispersion (1 mg/ml in demineralisiertem Wasser) auf einem mit Carbon als Trägerfilm stabilisierten Formvar Grid (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgebracht. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Nanopartikel mit 4 µl einer 2 % (m/V) wässrigen Uranylacetatlösung (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) als Negativfärbung versetzt. Die Elektronenmikroskopie wurde mit einem TECNAI G2-F20 (FEI, Eindhoven, Niederlande) bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer MegaView III Kamera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, München, Deutschland) aufgenommen.

Für die Charakterisierung der Nanopartikel mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden 2 µl einer Nanopartikeldispersion (1 mg/ml in demineralisiertem Wasser) zwischen zwei mit Carbon als Trägerfilm stabilisierten Formvar Kupfergrids (Plano GmbH) aufgebracht und für den Gefrierbruch schockgefroren (Jet-freezer JFD-030, BAL-TEC AG, Balzers, Lichtenstein). Der Gefrierbruch wurde mit einer BAF060-Einheit (BAL-TEC AG) bei -90 °C und  $5 \times 10^{-7}$  mbar durchgeführt. Anschließend wurde die Probe mittels Kathodenzerstäubung (Hummer X Sputtering System, Anatech LTD, Battle Creek, USA) bei 10 mA mit Gold behandelt. Die Bilder wurden mit einem Sigma-VP-REM (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) bei 6 kV mithilfe eines Inlens-Detektors aufgenommen.

### 2.2.3 Photostabilitätstest

Der Photostabilitätstest mit Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln wurde basierend auf der ICH-Leitlinie 279/95 in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt [206]. Die gefriergetrockneten, mit Retinol beladenen PLGA-Nanopartikel wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 22 °C einer, dem D65 Emissionsstandard entsprechenden, Tageslichtleuchtstoffröhre (Sylvania Luxline Plus F18W/685 Daylight, HORNBACH Baumarkt AG, Bornheim, Deutschland) für 24 h ausgesetzt. Als Positivkontrolle wurden reine Retinolkristalle und eine ethanolische Retinollösung (25 µg/ml) unter den gleichen Bedingungen behandelt. Als Negativkontrollen und 100 %-Bezugswert wurden Probengefäße

mit entsprechend gleichem Inhalt mit Aluminium umhüllt und direkt daneben platziert. Nach der 24-stündigen Expositionszeit wurde der Retinolgehalt aller Proben mittels HPLC quantifiziert und ausgewertet.

### 2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurden für Embelin und Retinol HPLC-Methoden auf Basis der ICH-Leitlinie Q2(R1) entwickelt. Das HPLC-System bestand aus einem Beckman System Gold® System, ausgerüstet mit einem Degaser (Gynkotek HPLC, Germering, Deutschland), einem System Gold® 126 Pumpsystem (Beckman Coulter GmbH), einem System Gold® 507e Autoinjektor (Beckman Coulter GmbH), einer RP-18 Säule (Synergi 4u Hydro-RP 80A, 250 x 4,60 mm, 4 µm Korngröße) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg, Deutschland), einem System Gold® 166 Detektor für die Quantifizierung von Embelin und Retinol im UV und sichtbarem Wellenlängenbereich und einem System Gold® 168 Diodenarray-Detektor (Beckman Coulter GmbH) als qualitative Kontrolle durch die Auswertung des Absorptionsspektrums. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Karat 32 Software V. 5.0 (Beckman Coulter GmbH).

Um den Anteil an Matrixbestandteilen der PLGA-Nanopartikel, biologischen Medien (bzw. die darin enthaltenen Proteine) und sonstige Störfaktoren der Probelösungen zu minimieren, wurden alle Proben mit Acetonitril 1:2 (V/V) verdünnt und anschließend zentrifugiert (5 min bei 30 000 g und 20 °C). Der Überstand wurde in HPLC-Probengefäße überführt. Jeweils 30 µl wurden mittels Autoinjektor in die HPLC injiziert. Als Matrixlösung dienten unbeladene PLGA-Nanopartikel, die analog hergestellt und behandelt wurden. Die Selektivität der Methode wurde in Gegenwart der Matrixlösungen, der Zellkulturmedien und Zellbestandteilen bestätigt. Dazu wurden die entsprechenden Versuche parallel mit unbeladenen Partikeln durchgeführt und die Proben äquivalent aufbereitet und mittels HPLC analysiert. Um neben der Retentionszeit die Identität der Wirkstoffe zu überprüfen und diese von ihren Abbauprodukten zu unterscheiden, wurde bei jedem HPLC-Lauf ein Spektrum aufgenommen und das Absorptionsmaximum bei der entsprechenden Retentionszeit überprüft. Die Bestimmung der Linearität wurde mit mehr als fünf Konzentrationen im linearen Bereich als externe Kalibrierung durchgeführt.

### 2.3.1 HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Embelin

Für die Quantifizierung von Embelin wurde eine HPLC-Methode mit Lösungsmittelgradient entwickelt. Für die mobile Phase wurde als Fließmittel A eine 0,1 % (V/V) trifluoressigsäure Lösung ( $\geq 99,9$  %, p.a. ISO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und als Fließmittel B Acetonitril ( $\geq 99,9$  %, p.a. ISO) (Carl Roth GmbH) bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min eingesetzt. Der Gradientenverlauf ist in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Als Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung diente eine externe Kalibriergerade, die die Konzentration von Embelin in Abhängigkeit von der Absorption bei einer Wellenlänge von 285 nm (Absorptionsmaximum von Embelin) zeigte. Für die nachfolgende Quantifizierung von Embelin wurden jeweils 30  $\mu$ l der entsprechenden Proben injiziert und bei 285 nm analysiert.

*Tabelle 2-1: Gradientenverlauf der HPLC-Methode für Embelin.*

<b>Zeit</b>	<b>Fließmittel A</b> (Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure)	<b>Fließmittel B</b> (Acetonitril)
Start	15 %	85 %
0 – 5 min	15 % $\rightarrow$ 5 %	85 % $\rightarrow$ 95 %
5 – 10 min	5 % $\rightarrow$ 10 %	95 % $\rightarrow$ 90 %
10 – 15 min	10 % $\rightarrow$ 15 %	90 % $\rightarrow$ 85 %
15 – 20 min	15 %	85 %

### 2.3.2 HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung für Retinol

Als mobile Phase wurden Fließmittel A, eine 0,5 % (V/V) essigsäure Lösung ( $\geq 99,9$  %, p.a. ISO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), und Fließmittel B, Acetonitril ( $\geq 99,9$  %, p.a. ISO) (Carl Roth GmbH), bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min eingesetzt. Der Gradientenverlauf ist in Tabelle 2-2 zusammengefasst. Als Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung diente eine externe Kalibriergerade, die die Konzentration von Retinol in Abhängigkeit von der Absorption bei einer Wellenlänge von 325 nm (Absorptionsmaximum von Retinol) zeigte. Für die nachfolgende Quantifizierung von Retinol wurden jeweils 30  $\mu$ l der entsprechenden Proben injiziert und bei 325 nm analysiert. Da die Proben z. T. Bestandteile von biologischen Medien (z. B. Farbindikator, Albumin, Zellbestandteile) enthielten, wurde dies in der Methodenentwicklung durch eine hydrophile Waschphase (0 bis 5 min und 10 bis 15 min) jeweils vor und nach der Elution des Retinols berücksichtigt.

Tabelle 2-2: *Gradientenverlauf der HPLC-Methode für Retinol.*

Zeit	Fließmittel A (Wasser mit 0,5 % Essigsäure)	Fließmittel B (Acetonitril)
Start	0 %	100 %
0 – 5 min	0 % → 100 %	100 % → 0 %
5 – 10 min	100 % → 85 %	0 % → 15 %
10 – 15 min	85 % → 0 %	15 % → 100 %

### 2.3.3 Berechnung der Beladungseffizienz und des Beladungsgrades der verwendeten Wirkstoffe

Die Beladungseffizienz gibt das prozentuale Verhältnis (m/m) von eingesetztem Wirkstoff zu tatsächlich beladenem Wirkstoff an. Die tatsächliche Masse an beladenem Wirkstoff ( $WS_b$  [mg]) wird durch den während der Herstellung eingewogenen Wirkstoff ( $WS_e$  [mg]) geteilt. Die Masse an beladenem Wirkstoff wurde an den entsprechenden gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikeln bestimmt:

$$BE = \frac{WS_b}{WS_e} \cdot 100 \%$$

*Formel 2-1: Berechnung der Beladungseffizienz (BE [%]).*

Der Beladungsgrad gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil (m/m) an beladenem Wirkstoff zu den applizierten PLGA-Nanopartikeln ist. Die Masse an beladenem Wirkstoff ( $WS_b$  [mg]) wird durch die Summe an eingewogenem Wirkstoff ( $WS_e$  [mg]) und PLGA ( $M$  [mg]) geteilt. Die Masse an beladenem Wirkstoff wurde an den entsprechenden gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikeln bestimmt:

$$BG = \frac{WS_b}{WS_e + M} \cdot 100 \%$$

*Formel 2-2: Berechnung des Beladungsgrades (BG [%]).*

Für die Bestimmung der Beladungseffizienz bzw. des Beladungsgrades wurden etwa 5 mg der beladenen Nanopartikel in 50 ml eines Gemisches aus Acetonitril und Wasser (50:50 (V/V)) mit 0,1 % (V/V) Essigsäure gegeben und für 1 h bei 300 UPM und 22 °C gerührt. Anschließend wurde eine Probe gezogen, bei 30 000 g zentrifugiert und der Wirkstoffgehalt im Überstand mittels HPLC quantifiziert.

## 2.4 *In vitro*-Freisetzung

Alle Freisetzungsstudien wurden unter Sink-Bedingungen (entsprechend Ph. Eur. 5.17.1) in 40 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS vom engl. „*phosphate buffered solution*“) bei pH 7,4 mit 20 % (V/V) Ethanol als Lösungsvermittler durchgeführt, um eine pH-Verschiebung durch den PLGA-Abbau zu vermeiden. Die Herstellung von PBS erfolgte durch Lösen von 1,46 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 8 g Natriumchlorid und 0,2 g Kaliumchlorid (alle Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml deionisiertem Wasser (Q-Pod™ MilliQ, Millipore™, Billerica, USA). Der pH-Wert wurde mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung oder 0,1 N Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung bei 121 °C für 15 min bei 2 bar autoklaviert (Varioklav 65T, Thermo Scientific) und das verdunstete Wasser ergänzt. Um eine Aussage über die prozentuale Freisetzung des beladenen Wirkstoffes treffen zu können, wurde der Beladungsgrad im Vorfeld bestimmt (Kapitel 2.3.3).

Gefriergetrocknete, mit Wirkstoff beladene PLGA-Nanopartikel wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchen im Freisetzungsmedium dispergiert und bei 37 °C einer horizontalen Rotation (70 UPM) ausgesetzt. Zu festgelegten Zeitpunkten (8 und 12 h) wurden Aliquote entnommen und bei 25 000 g für 5 min zentrifugiert (Beckman Coulter GmbH). Das entnommene Volumen (1 ml) wurde durch frisches Freisetzungsmedium ersetzt. **Antiinflammatorische Aktivität in humanen neutrophilen Granulozyten**

Die verwendeten humanen neutrophilen Granulozyten wurden aus peripherem heparinisierten Blut von gesunden erwachsenen Blutspendern (12 h Nüchternheit), des Universitätsklinikums Jena in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Werz (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische/Medizinische Pharmazie) isoliert (gemäß Lizenz-Nr.: 4968-11/16 genehmigt durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Jena, Deutschland). Die Spender hatten dabei zuvor innerhalb von mindestens zehn Tagen keine antiinflammatorischen Wirkstoffe zu sich genommen. Aus dem Vollblut wurde durch Zentrifugieren bei 4000 g für 20 min bei 20 °C, basierend auf der Methode nach Boyum *et al.*, ein Leukozytenkonzentrat hergestellt [207]. Das Leukozytenkonzentrat wurde anschließend mit Dextran (500 000 g/mol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Mit Hilfe eines Lymphozyten-Separations-Mediums (LSM1077, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) wurden die neutrophilen Granulozyten durch eine weitere Zentrifugation separiert. Die neben den neutrophilen



Granulozyten verbliebenen Erythrozyten wurden hypotonisch lysiert. Die neutrophilen Granulozyten wurden zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen, anschließend in einem Zellkulturmedium bestehend aus Dulbeccos-Puffer (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 0,1 % (m/V) Glucose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 1 mM Calciumchlorid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert, gezählt und durch Verdünnen mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 5 Millionen Zellen pro ml eingestellt.

Gefriergetrocknete Nanopartikel wurden 30 min vor Versuchsbeginn in Dulbeccos-Puffer (SERVA Electrophoresis GmbH) dispergiert. In Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöstes Zileuton (Sequoia Research Products Ltd., Oxford, Großbritannien) diente als Inhibitorkontrolle für die 5-Lipoxygenase (5-LOX). Als Negativkontrolle dienten die Lösungsmittelkontrolle (z. B. DMSO), das Dispersionsmedium (Dulbeccos-Puffer) und die entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikel. Die verwendeten neutrophilen Granulozyten wurden 30 min bei 37 °C mit den Probelösungen bzw. der Nanopartikeldispersion vorinkubiert und anschließend mit 2,5 µM Calcium-Ionophor A23187 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 20 µM Arachidonsäure (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) für 10 min stimuliert. Durch Zugabe von eisgekühltem Methanol (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) wurden die Zellen lysiert und die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach Zugabe von 200 ng Prostaglandin B<sub>1</sub> (PGB<sub>1</sub>), als interner Standard, wurde die Probe einer Festphasenextraktion mit C18 RP-Säulen (100 mg, UCT Inc., Bristol, USA) zugeführt. Die Proben wurden mittels Methanol aus der Festphase eluiert, in HPLC-Probengefäße überführt und mittels HPLC über eine C-18 Radial-PAK Säule (Waters, Eschborn, Deutschland; für die HPLC geeignete Lösungen von VWR International GmbH) analysiert und wie von Steinhilber *et al.* beschrieben, quantifiziert [208]. Die durch die 5-LOX gebildeten Produkte wie die all-trans-Isomere des Leukotriens B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), die 5-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (5-HpETE) und die 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) wurden als Marker für die Aktivität der 5-LOX mittels HPLC quantifiziert.

## 2.6 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Laminar Air Flow Werkbank (Hera Safe HS 18, Thermo Scientific, Waltham, USA). Für die *in vitro* Toxizitätsuntersuchungen der hergestellten PLGA-Nanopartikel wurden L929 murine Fibroblasten (ACC-2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ),

Braunschweig, Deutschland) verwendet. Für Freisetzungsversuche an einer physiologischen Barriere wurden heterogene humane epitheliale colorektale Adenocarcinom (Caco-2) -Zellen (ACC-169, DSMZ) verwendet.

Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank (Binder CO<sup>2</sup>-Incubator CB 150, Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 15 ml des jeweiligen Kultivierungsmediums (Kapitel 2.6.1 und 2.6.2) inkubiert und nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz passagiert. Zum Passagieren wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit sterilem PBS bei pH 7,4 gewaschen, anschließend 1,8 ml einer 0,25 % (m/V) Trypsinlösung in PBS hinzugegeben und für 5 min im Brutschrank inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden in 6,8 ml Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 200 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt (Vacusafe comfort, IBS, Fernwald, Deutschland) und das Zellpellet mit 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden unter einem inversen Lichtmikroskop (Zeiss Primo Vert, AxioCAM ERc 5 Kamera, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland) gezählt und erneut ausgesät. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils nach 5 – 7 Tagen (je nach Konfluenz) passagiert.

#### 2.6.1 CellTiter-Glo®-Assay

Murine L929-Fibroblasten wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Zellkulturmedium Medium (PAA, Pasching, Österreich) mit 1 % L-Glutamin und 10 % fetalem Kälberserum (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) kultiviert. Für die toxikologischen Versuche wurden 8 500 Zellen pro Well auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und für 24 h inkubiert. Die zu untersuchenden Nanopartikel wurden in Zellkulturmedium in der gewünschten Konzentration (0,1 bis 1,0 mg/ml) dispergiert und auf 37 °C vorgewärmt. Für die Zytotoxizitätsversuche wurde das Zellkulturmedium in der 96-Well-Mikrotiterplatte durch die Nanopartikeldispersion ersetzt und für weitere 24 h bei gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen je Well mit 100 µl des CellTiter-Glo®-Reagenzes (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) bei Raumtemperatur lysiert. Adenosintriphosphat (ATP) diente als Surrogat für die Zellviabilität. Mithilfe der entstandenen Lumineszenz wurde die

Zellviabilität entsprechend der Herstelleranweisung des CellTiter-Glo®-Assays (Promega GmbH) quantifiziert. Das Lumineszenzsignal wurde mit dem Spark 10M Mikrotiterplattenleser (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen und ausgewertet. Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte mit Zellkulturmedium (ohne Zellen) dienten als Blindwert, unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und mit einer 0,02 % (m/V) Thiomersallösung (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. Zudem wurden die Zellen qualitativ unter einem inversen Lichtmikroskop (Zeiss Primo Vert, AxioCAM ERc 5 Kamera, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) hinsichtlich toxikologischer Effekte nach ISO 10993-5:2009 untersucht.

### 2.6.2 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden in Minimum Essential Medium mit Earle's Balanced Salt Solution (MEM/EBSS) (HyClone Laboratories, Little Chalfont, UK) mit 20 % fetalem Kälberserum (Thermo Fisher Scientific Inc.), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 100 U/ml nicht-essentielle Aminosäuren (HyClone Laboratories) kultiviert. Es wurden 200 000 Zellen pro Transwell auf 12-Costar Transwell® Platten (12 mm Insertdurchmesser, 0,4 µm Porengröße, Polycarbonatmembran) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ausgesät und für bis zu 25 Tage bei zweitägigem Mediumwechsel kultiviert. Um die Integrität der Zellmonolayer sicherzustellen, wurde direkt vor und nach den Freisetzungsversuchen der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der Zellmonolayer durch ein TEER-Messgerät (Millicell-ERS 64946-05D, Millipore/Merck KGaA) bestimmt. Dazu wurden die zwei Elektroden des TEER-Messgerätes auf der basolateralen und luminalen Seite des Zellmonolayers platziert und die Spannung zwischen den Elektroden gemessen. Transwells ohne Zellen dienten als Blindwert für die Berechnung des effektiven TEER-Wertes. Es wurden ausschließlich Zellmonolayer mit TEER-Werten  $> 300 \Omega/\text{cm}^2$  für die Freisetzungsversuche genutzt.

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -Dextran (21 200 g/mol, 0,009 mol/mol Glukose) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde als Transportkontrolle eingesetzt um – zusätzlich zum TEER-Wert – die Integrität der Zellmonolayer zu überprüfen. Als Akzeptanzkriterium für die Integrität der Zellmonolayer durfte eine maximale FITC-Dextran-Permeation von 1 % über 8 h nicht überschritten werden [204]. Die untersuchten Nanopartikel wurden mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg/ml dispergiert und auf 37 °C vorgewärmt. Das in der 12-Costar Transwell® Platte auf der apikalen/luminalen (500 µl) und basolateralen (1500 µl) Seite vorhandene Zellkulturmedium wurde abgesaugt, die Nanopartikeldispersion

(500 µl) auf der apikalen/luminalen Seite hinzugegeben und anschließend die basolaterale Seite mit Zellkulturmedium (1500 µl) gefüllt. Nach 30 min und 1, 2, 4 und 8 h wurden 50 µl von der apikalen/luminalen, sowie der basolateralen Seite als Probe entnommen. Nach 8 h wurde der Freisetzungsversuch abgeschlossen, die Inserts mit Zellkulturmedium zweimal gewaschen, anschließend in 50 ml Probengefäße überführt und 5 ml Acetonitril zugegeben, um die Zellmonolayer auf den Inserts zu lysieren. Die gesammelten Proben wurden bei 30 000 g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert (Beckman Coulter GmbH) und der Wirkstoffgehalt im Überstand mittels HPLC quantifiziert.

## 2.7 Der schalenlose Hühnerei-Test an der *Chick-Area-Vasculosa* (HET-CAV)

Mittels HET-CAV wurden Toxizitätsprofile der eingesetzten Wirkstoffe, der unbeladenen PLGA-Nanopartikel und der mit Wirkstoff beladenen PLGA-Nanopartikel ermittelt. Dazu wurden die PLGA-Nanopartikel oder Wirkstoffe in Ringerlösung (pH 7) dispergiert bzw. gelöst und entweder lokal auf eine Seite der *Chick-Area-Vasculosa* (CAV) aufgetragen oder, für systemische Untersuchungen, in die Dottersackvene injiziert (Abbildung 3-16). Die für die Versuche genutzten befruchteten Hühnereier wurden von einem lokalen Anbieter bezogen. Die Eier wurden für 72 h bei 37 °C und 80 % Luftfeuchte inkubiert und anschließend der Inhalt pro Hühnerei in je eine Petrischale mit Ringerlösung (pH 7) überführt [75]. Nach einer Stunde wurden die Eier, die einen beschädigten Eidotter zeigten, oder nicht mindestens im Entwicklungsstadium 14 nach Hamburger & Hamilton waren, aussortiert [187]. Die verbliebenen Eier wurden für die Versuche genutzt. Während der Versuche wurden die Eier in den Petrischalen direkt nach der Applikation und nach 1, 2, 4, 8 und 24 h fotografiert. Die Bilder wurden anschließend bezüglich Veränderungen bewertet und folgende Effekte wurden erfasst: Aggregation der Blutbestandteile, Hämolyse, Hämorrhagie und vaskuläre Lyse. Ein fehlender Herzschlag über mehr als 4 h wurde als Tod gewertet.

### 2.7.1 Lokaler Hühnerei-Test an der *Chick-Area-Vasculosa*

Nachdem der Inhalt der Hühnereier nach 72 h Bebrütungszeit in Petrischalen transferiert wurde, wurden die zu untersuchenden Proben aufgetragen. Von jeder Probe wurden 5 µl auf einer Seite der CAV an zwei verschiedenen Stellen aufgetragen (Abbildung 3-16). Die unbeprobte bzw. mit Ringerlösung behandelte Seite, diente als interner Direktvergleich der lokalen Effekte. Es wurden nach diesem Schema mindestens fünf unterschiedliche CAV zusammen beprobt. Als Negativkontrolle diente Ringerlösung (pH 7). Als Positivkontrolle diente 1 % (m/V) Natriumdodecylsulfatlösung. Für die Auswertung der lokalen Applikation

wurde zuerst ein Effektefaktor je beprobter CAV berechnet (Formel 2-3). Anschließend wurde dieser Faktor in die Formel 2-4 eingesetzt, um die Häufigkeit der auftretenden toxischen Effekte zu berechnen.

$$EF = \frac{E_{A1} + E_{A2}}{2}$$

*Formel 2-3: **Berechnung des Effektefaktors (EF) je CAV.** Je nachdem ob der beobachtete Effekt (Hämolyse, vaskuläre Lyse, Hämorrhagie und/oder Aggregation der Blutbestandteile) an keinem, an einem oder an beiden Applikationsort(en) der CAV auftritt, ergibt sich ein Faktor von 0, ½ oder 1.*

$$A_{E(\text{lokal})} = \sum_i (EF_i) / i \cdot 100 \%$$

*Formel 2-4: **Berechnung der Häufigkeit ( $A_{E(\text{lokal})}$  [%]) toxischer Effekte bei lokaler Applikation.** Die Häufigkeit ( $A_{E(\text{lokal})}$  [%]) mit der die jeweiligen Effekte auftreten, ergibt sich aus der Summe der Einzeleffekte ( $EF_i$ ), geteilt durch die Anzahl (i) an beprobten CAV mal 100 %.*

### 2.7.2 Systemischer Hühnerei-Test an der *Chick-Area-Vasculosa*

Die systemische Applikation wurde ebenfalls am schalenlosen Hühnerei in Petrischalen durchgeführt. Dazu wurden die schalenlosen Hühnereier weitere 24 h in den Petrischalen bei gleichen Bedingungen inkubiert und auf Vitalitätsparameter (Herzschlag, intakter Eidotter, Unversehrtheit der Blutgefäße etc.) überprüft und ggf. vor Versuchsbeginn aussortiert. Nach einer Bebrütungszeit von insgesamt 96 h wurden 2 µl der zu untersuchenden Probe in die Dottersackvene injiziert (Abbildung 3-16). Es wurden nach diesem Schema mindestens fünf unterschiedliche CAV zusammen beprobt. Die Injektion wurde mithilfe eines Mikroinjektors (Sutter Instrument Company, Novato, USA), mit eingespannter Borosilikatglaskapillare, unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Das Blutvolumen beträgt zu diesem Zeitpunkt (nach 96 h Bebrütungszeit) ungefähr 100 µl, demzufolge wurden die Lösungen beim Injizieren etwa 1:50 verdünnt [209, 210]. Als Negativkontrolle diente eine 0,9 % (m/V) Natriumchloridlösung (Carl Roth GmbH). Als Positivkontrolle diente eine Lösung mit 25 mg/ml verzweigtem Polyethylenimin mit einer molaren Masse von 25 kDa (Carl Roth GmbH) [211].

$$A_{E(\text{systemisch})} = \sum_i (E_i) / i \cdot 100 \%$$

*Formel 2-5: **Berechnung der Häufigkeit ( $A_{E(\text{systemisch})}$  [%]) toxischer Effekte bei systemischer Applikation.** Die Häufigkeit ( $A_{E(\text{systemisch})}$  [%]) mit der die jeweiligen Effekte auftreten, ergibt sich aus der Summe des jeweiligen Effekts (E), geteilt durch die Anzahl (i) an beprobten CAV mal 100 %.*

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel – Herstellung und Charakterisierung

##### 3.1.1 Übersicht über den Prozessablauf

Die Herstellung der PLGA-Nanopartikel wurde mithilfe einer Emulsionsmethode basierend auf der Methode nach Kumar *et al.* durchgeführt (Kapitel 2.1) [205]. Der komplexe Herstellungsprozess bietet durch die vielfältigen und anpassungsfähigen Herstellungsparameter zahlreiche Möglichkeiten die Herstellung für den Wirkstoff bzw. das entsprechende Trägermaterial individuell anzupassen. Als Polymer wurde PLGA in einem Verhältnis von 50:50 mit endständiger Veresterung eingesetzt, welches bei der Herstellung von PLGA-Partikeln häufig zum Einsatz kommt. Als organische Phase wurde Ethylacetat (EA) aufgrund seiner niedrigen Toxizität ( $LD_{50}$  Ratte<sub>oral</sub>: 5620 mg/kg) und des guten Lösungsvermögens von PLGA und der beiden Wirkstoffe verwendet [212]. Ethylacetat kann am Ende des Herstellungsprozesses aufgrund seiner partiellen Mischbarkeit mit Wasser und dem hohen Dampfdruck über mehrere Waschschrte und Evaporation bei Raumtemperatur aus der inneren Phase eliminiert werden. Somit ist ein Aushärten der PLGA-Nanopartikel meist auch ohne thermische Belastung des Wirkstoffes innerhalb weniger Stunden möglich [213]. Als Grenzflächenstabilisator diente PVA mit einem Anteil von 2 % (m/V) in der wässrigen Phase dazu, die Emulsion während des Herstellungsprozesses thermodynamisch zu stabilisieren und anschließend während des Aushärtens der PLGA-Nanopartikel diese gegen Aggregation zu schützen. Während der Aushärtung verbleibt ein Teil des PVA an der Oberfläche der PLGA-Nanopartikel und verhindert durch die sterische Abschirmung ein Aggregieren der PLGA-Nanopartikel [214]. Um die hergestellten PLGA-Nanopartikel lagern zu können, wurden diese zuerst schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Es entstand ein weißes feines Pulver, das in wässrigen Medien leicht zu dispergieren war. Somit konnten die gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikel als Ausgangssubstanz für die folgenden Versuche in einer definierten Masse im jeweiligen Medium dispergiert werden.

Die Charakterisierung der hergestellten PLGA-Nanopartikel ist ein zentraler Punkt bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Die während dieser Arbeit hergestellten PLGA-Nanopartikel wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) vermessen, statistisch ausgewertet und die Ergebnisse mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigt. Bei der Messung der Partikelgröße

mittels PCS wird Licht über einen Laser in die Probe gebracht und die Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität gemessen. Basierend auf der Brown'schen Molekularbewegung der Partikel in fluiden Medien erhält man als Messgröße die Intensität der Streulichtmuster über die Zeit. Daraus kann mittels Software über die Stoke-Einstein-Gleichung (Formel 3-1) die Partikelgröße berechnet werden [215]. Aufgrund der Hydrathülle, die ein Partikel in wässrigen Medien besitzt, wird durch die PCS der hydrodynamische Durchmesser (HD) der Partikel gemessen.

$$r_h = \frac{K \cdot T}{6 \cdot D \cdot \pi \cdot \eta}$$

*Formel 3-1: Stokes-Einstein-Gleichung. Berechnung des hydrodynamischer Partikelradius ( $r_h$  [m]) über die Boltzmann-Konstante ( $K$  [J/K]), absolute Temperatur ( $T$  [K]), Diffusionskonstante ( $D$  [m<sup>2</sup>/s]) und dynamische Viskosität ( $\eta$  [Pa\*s]).*

Zusammen mit der Quellfähigkeit, die PLGA in wässrigen Medien aufweisen kann, sind die über TEM und REM ermittelten Partikeldurchmesser in der Regel kleiner.

Da eine Aussage über die mittlere Partikelgröße nur mit Bezug auf die Grundgesamtheit aussagekräftig ist, wurde ergänzend für jede Charge die Partikelgrößenverteilung über den Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt. Da für die Entwicklung eines effektiven Wirkstoffträgersystems vor allem große Partikel eine Verunreinigung darstellen, wurde die Berechnung der mittleren Partikelgröße bzw. des PDI intensitätsgewichtet durchgeführt. Im Gegensatz zu einer volumen- oder anzahlgewichteten Verteilung, werden durch die intensitätsgewichtete Verteilung größere Partikel besonders stark berücksichtigt und stellt daher die kritischste Berechnung der Partikelgrößenverteilung dar. Die Berechnung des PDI erfolgt in der Regel über eine theoretische Korrelationsfunktion, die für den mittleren Partikeldurchmesser logarithmiert wird um eine Gerade zu erhalten. Liegt die gemessene Korrelationsfunktion auf der theoretischen Korrelationsfunktion für die entsprechende Partikelgröße, ist der PDI null. Je weiter die gemessene Korrelationsfunktion von der theoretischen Korrelationsfunktion abweicht, desto größer wird der PDI (bis zu einem Maximalwert von 1,0) und dementsprechend größer ist die Partikelgrößenverteilung [216]. Ein PDI von unter 0,1 gilt nach ISO 22412:2008 als monodispers.

Als Orientierung gilt Folgendes [217, 218]:

- $PDI < 0,1$   $\triangleq$  monodisperse Verteilung
- $0,1 \leq PDI \leq 0,3$   $\triangleq$  enge Partikelgrößenverteilung
- $0,3 < PDI < 0,5$   $\triangleq$  breite Partikelgrößenverteilung
- $PDI \geq 0,5$   $\triangleq$  polydisperse Partikelgrößenverteilung

Die aus der PCS-Analyse erhaltenen Parameter (HD, PDI) dienten als Qualitätsmerkmale für die Herstellung und als Entscheidungsgrundlage, ob die hergestellten Nanopartikel für weitere Versuche, wie z. B. Freisetzungsversuche, genutzt werden konnten. Eine Übersicht der hergestellten PLGA-Nanopartikel und deren physikochemischen Charakterisierung nach hydrodynamischem Durchmesser (HD), Polydispersitätsindex (PDI), sowie das ermittelte Zetapotential (ZP) ist in Tabelle 3-1 dargestellt. Rückschlüsse auf die Oberflächenmorphologie der PLGA-Nanopartikel wurden mit Hilfe der elektrophoretischen Mobilität der Nanopartikel mittels Laser-Doppler-Anemometrie in Kombination mit TEM-Aufnahmen gezogen. REM- bzw. TEM-Aufnahmen wurden stichprobenhaft durchgeführt. Im Rahmen der Robustheitsuntersuchungen wurde das Volumen der inneren und der äußeren Phase sowie die Einwaage an PLGA (für die Herstellung) verdreifacht bzw. verfünffacht, andere Herstellungsparameter blieben unverändert (Kapitel 3.1.2.2). Für die Herstellung von modifizierten PLGA-Nanopartikeln wurden 5 mg Chitosan oder 50 mg humanes Serumalbumin (HSA) in die wässrige Phase zugegeben. Die Beladungseffizienz wurde für jede Herstellungscharge durch eine chromatographische Quantifizierung des Wirkstoffs mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt, da durch die Anwesenheit der Matrixbestandteile, sowie der genutzten Hilfsstoffe und Zellkulturmedien keine zuverlässige Quantifizierung der Wirkstoffe über ein UV-Spektrometer möglich war. Die HPLC-Methoden wurden basierend auf der ICH-Richtlinie Q2(R1) entwickelt. Bei den angewendeten HPLC-Methoden traten keinerlei Störpeaks bei der entsprechenden Wellenlänge in dem Retentionsbereich der Wirkstoffe (Embelin bzw. Retinol) auf. Alle angewendeten HPLC-Methoden wiesen einen linearen Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) größer 0,98 auf. Die Freisetzungsversuche wurden sowohl in gepufferter Salzlösung als auch in biologischem Medium durchgeführt. Ferner wurden Stabilitätsstudien stichprobenhaft durchgeführt.



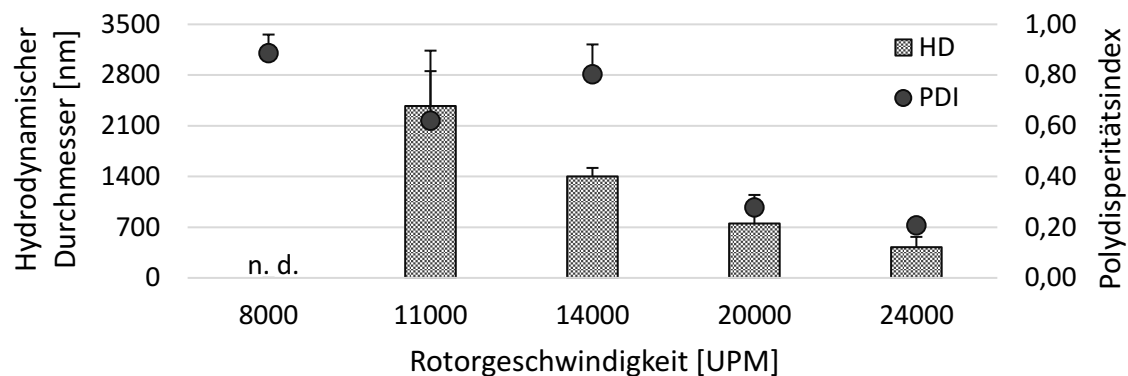
### 3.1.2 Methodenentwicklung der Nanopartikelherstellung

#### 3.1.2.1 Optimierung der Prozessparameter

Die Herstellungsmethode wurde zunächst für wirkstofffreie PLGA-Nanopartikel optimiert, um als Basis für die spätere Wirkstoffbeladung zu dienen. Die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung dienten als Qualitätsparameter für die Partikelherstellung. Ziel war eine möglichst enge Partikelgrößenverteilung ( $PDI \leq 0,3$ ) und ein Durchmesser von  $\leq 200$  nm. Eine Optimierung der Herstellungsmethode ist an einer Vielzahl von Parametern denkbar. Für die Optimierung der Herstellungsmethode wurden daher besonders kritische Einstellungen, wie die Umdrehungsgeschwindigkeit des Homogenisators, die Konzentration des Stabilisators, die Temperatur der Emulsion und die Zentrifugationsgeschwindigkeit bei der Aufreinigung der Nanopartikel untersucht.

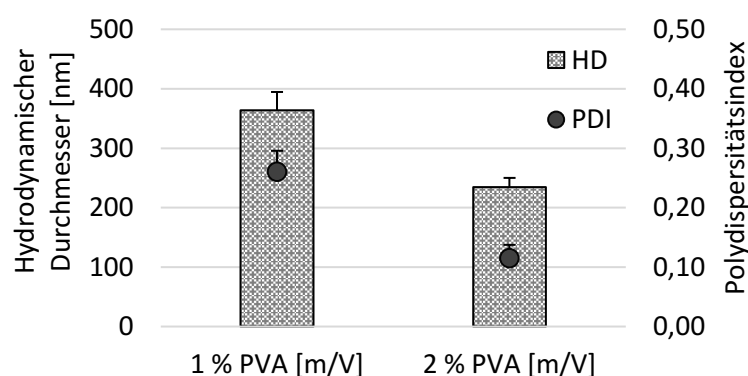
Um während der Herstellung der PLGA-Nanopartikel die grobdisperse Emulsion aus organischer inneren Phase und wässrigen äußeren Phase in eine feindisperse Nanoemulsion zu überführen, war ein Homogenisierungsschritt nötig. Je höher der Energieeintrag in diesem Herstellungsschritt war, desto feiner war in der Regel die Verteilung der inneren in der äußeren Phase und dementsprechend kleiner waren die Tropfen der inneren Phase. Die Energie wurde über ein Rührwerkzeug, welches nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeitet, eingebracht. Die mittlere Partikelgröße nahm dementsprechend mit steigendem Energieeintrag bzw. steigender Rührgeschwindigkeit ab (Abbildung 3-1). Die Vergrößerung der Oberfläche kann durch die verrichtete Arbeit [J] pro Fläche [ $m^2$ ] ausgedrückt werden. Dementsprechend verhält sich der benötigte Energieeintrag in der Regel exponentiell zur Verringerung der Partikelgröße. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 8 000 Umdrehungen pro Minute (UPM) waren die Partikel zu groß um zuverlässig mittels PCS charakterisiert zu werden (Kapitel 1.1.3). Eine Rührgeschwindigkeit von 11 000 UPM führte zu einer Partikelgröße im Größenbereich von 2 300 nm. Durch eine Erhöhung der Umdrehungszahl von 14 000 UPM bis zu technisch maximal möglichen 24 000 UPM, verringerte sich der HD von 1 400 nm auf 426 nm. Die Partikelgrößenverteilung wurde enger mit steigendem Energieeintrag bzw. steigender Rührgeschwindigkeit, da mit steigendem Energieeintrag die innere Phase homogener vorliegt als bei einer grobdispersen Emulsion (Kapitel 1.1.2). Die Partikelgröße war bei einer Rotorgeschwindigkeit von  $\leq 14$  000 UPM polydispers ( $PDI \geq 0,5$ ) verteilt. Bei einer Rotorgeschwindigkeit von  $\geq 20$  000 UPM wurde eine enge Partikelgrößenverteilung ( $PDI$  0,3 bis 0,5) erhalten.

Basierend auf den Ergebnissen für die Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung wurde für die Herstellung der Nanopartikel eine Rührgeschwindigkeit von 24 000 UPM gewählt.



**Abbildung 3-1: Herstellung der PLGA-Nanopartikel mit unterschiedlichen Rotorgeschwindigkeiten.** Die Geschwindigkeit des Rotors wurde zwischen 8 000 und 24 000 UPM variiert. Die Partikelgröße und der PDI wurden mittels PCS bestimmt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

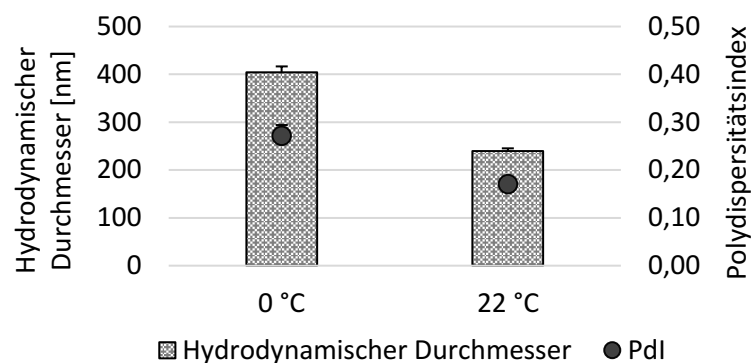
Um ein Zusammenfließen der inneren Phase zu verhindern und die Emulsion thermodynamisch zu stabilisieren, sollte die Stabilisator-Konzentration bzw. die Anzahl an Stabilisator-Molekülen ausreichen, um die Grenzflächen der beiden Phasen zu besetzen. Je kleiner die Tropfen der inneren Phase, desto höher muss die Stabilisator-Konzentration aufgrund der größeren Grenzfläche sein [219]. Eine Verdopplung der PVA-Konzentration von 1 % auf 2 %, in der wässrigen Phase während der Herstellung, führte zu etwa 1,5-fach kleineren Partikeln (von  $364 \pm 31$  nm auf  $234 \pm 16$  nm) und einer Halbierung des PDI (von  $0,26 \pm 0,04$  auf  $0,12 \pm 0,02$ ) (Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: Herstellung der PLGA-Nanopartikel mit unterschiedlichen Stabilisator-Konzentrationen (1 % bzw. 2 % PVA).** Die Partikelgröße und der PDI wurden mittels PCS bestimmt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Dementsprechend wurde eine PVA-Konzentration von 2 % für die wässrige Phase gewählt.

Um thermolabile Wirkstoffe einer möglichst geringen thermischen Belastung auszusetzen, wurde die Herstellung in Eiswasser durchgeführt und mit der Durchführung bei Raumtemperatur verglichen (Abbildung 3-3). Die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln bei einer niedrigeren Temperatur führte zu einem größeren Partikeldurchmesser von 364 nm und einer breiteren Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,27 \pm 0,02$ ), verglichen zu den bei Raumtemperatur hergestellten PLGA-Nanopartikeln (HD 240 nm,  $PDI < 0,17 \pm 0,01$ ). Dementsprechend wurde die Herstellung bei Raumtemperatur gewählt.



*Abbildung 3-3: Herstellung der PLGA-Nanopartikel bei verschiedenen Temperaturen. Die Partikelgröße und der PDI wurden mittels PCS bestimmt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus fünf PCS-Messungen innerhalb eines Versuchs.*

Die Aufreinigung der PLGA-Nanopartikel erfolgte durch Zentrifugation. Es zeigte sich in der Aufreinigung ein Zusammenhang zwischen der Zentrifugationsgeschwindigkeit und der Partikelgröße sowie der Partikelgrößenverteilung (Abbildung 3-4). Durch die Steigerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit wurden auch kleinere PLGA-Nanopartikel erfasst und der durchschnittliche HD verringerte sich. Eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 5 000 UPM führte zu einem HD von  $336 \pm 13$  nm. Eine Verdopplung der Geschwindigkeit auf 10 000 UPM führte zu kleineren Nanopartikeln mit einem HD von  $262 \pm 16$  nm. Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 15 000 und 25 000 UPM führten zum vergleichsweise kleinsten HD von ca. 227 nm. Bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 5 000 – 15 000 UPM lag der PDI der aufgereinigten Nanopartikel im Größenbereich von 0,2. Die engste Partikelgrößenverteilung wurde durch eine Zentrifugation mit 25 000 UPM erreicht ( $PDI\ 0,14 \pm 0,3$ ). Eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von über 25 000 UPM führte zu einem Pellet, das sich nicht mehr dispergieren ließ. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 25 000 UPM (entspricht 22 000 g) gewählt.

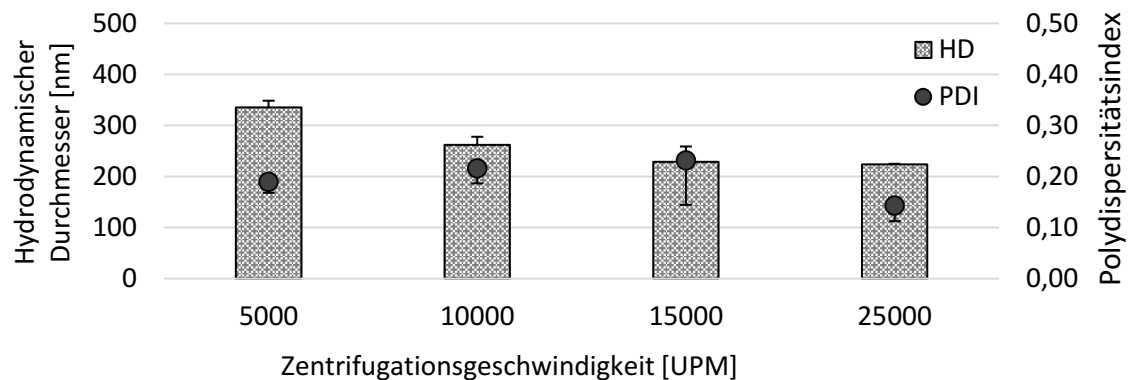


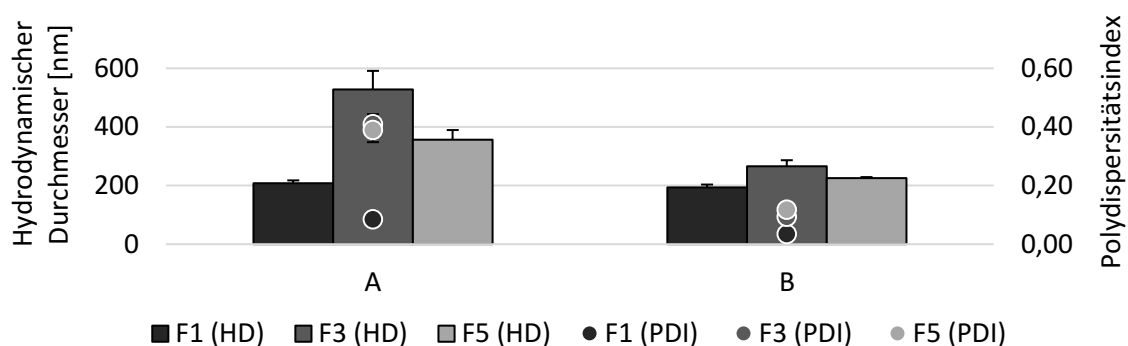
Abbildung 3-4: **Aufreinigung der hergestellten PLGA-Nanopartikel bei unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten.** Die Aufreinigung wurde jeweils durch zwei Zentrifugations- bzw. Waschschrte durchgeführt. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand gegen deionisiertes Wasser ausgetauscht und das Pellet dispergiert. Die Partikelgröße und der PDI wurden mittels PCS bestimmt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.2.2 Robustheit der PLGA-Nanopartikelherstellung

Neben der Optimierung der Prozessparameter für die Herstellung und der Aufreinigung, wurde die Robustheit der Methode durch die Herstellung in einem größeren Maßstab (*Upscaling*) untersucht. Um ein *Upscaling* der Herstellung zu simulieren, wurde die Herstellung der PLGA-Nanopartikel neben einem einfachen Ansatz (F1) (50 mg PLGA-Einwaage in 5 ml EA als innere Phase und 5 ml deionisiertes Wasser als äußere Phase), mit dreifachem Ansatz (F3) (150 mg PLGA-Einwaage in 15 ml EA als innere Phase und 15 ml deionisiertes Wasser als äußere Phase) und mit fünffachem Ansatz (F5) (250 mg PLGA-Einwaage in 25 ml EA als innere Phase und 25 ml deionisiertes Wasser als äußere Phase) durchgeführt. Alle anderen Herstellungsparameter blieben unverändert. Ziel war eine gleichbleibende Qualität der Nanopartikel bezogen auf HD ( $\leq 270$  nm) und PDI ( $\leq 0,2$ ) zu erreichen. Aufgrund des *Upscalings* änderte sich die Qualität der hergestellten PLGA-Nanopartikel (Abbildung 3-5 A), was durch eine anschließende Filtration ausgeglichen werden konnte.

PLGA-Nanopartikel, die mit einfachem Ansatz (F1) hergestellt wurden, zeigten einen HD von  $208 \pm 10$  nm und eine monodisperse Partikelgrößenverteilung mit einem PDI von  $0,09 \pm 0,02$ . Die Filtration der Nanopartikel, führte zu einem um 15 nm verringerten HD ( $193 \pm 10$  nm) und einer etwas engeren Partikelgrößenverteilung (PDI  $0,03 \pm 0,03$ ). Die PLGA-Nanopartikel, die mit dreifachem Ansatz (F3) hergestellt wurden, zeigten einen größeren HD von  $528 \pm 64$  nm und eine breite Partikelgrößenverteilung mit einem PDI von  $0,41 \pm 0,06$  und lagen somit außerhalb der Zielparameter (HD  $\leq 270$  nm und PDI  $< 0,1$ ). Die Filtration dieser Nanopartikel

fürte nahezu zu einer Halbierung des HD ( $266 \pm 21$  nm) und einer monodispersen Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,09 \pm 0,01$ ). Die PLGA-Nanopartikel, die mit fünffachem Ansatz (F5) hergestellt wurden, zeigten ebenfalls einen größeren HD ( $357 \pm 32$  nm) und eine breite Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,39 \pm 0,05$ ). Die Filtration dieser Nanopartikel, führte ebenfalls zu einem kleineren HD ( $225 \pm 4$  nm) und einer engeren Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,12 \pm 0,03$ ) und dazu, dass auch hier beide Qualitätsziele (HD und PDI) erreicht wurden. Die Tendenz der Partikelgröße ( $F1 < F5 < F3$ ) bezogen auf den Ansatz änderte sich durch die Filtration nach der Herstellung nicht. Aufgrund der geringen Ausbeute nach der angewendeten Filtration, wurden die Nanopartikel schlussendlich mit einfachem Ansatz ohne anschließenden Filtrationsschritt hergestellt.



**Abbildung 3-5: Upscaling der Partikelherstellung – Physikochemische Charakterisierung mittels PCS.** HD und PDI der PLGA-Nanopartikel (**A**) des größeren Herstellungsansatzes und (**B**) nach anschließender Filtration der hergestellten PLGA-Nanopartikel mit einem Celluloseacetat (CA) -Filter (Porengröße  $0,2\ \mu\text{m}$ ). Die Partikelgröße und der PDI wurden mittels PCS bestimmt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.3 Physikochemische Charakterisierung von unbeladenen PLGA-Nanopartikeln

Basierend auf der vorangegangenen Methodenoptimierung, erfolgte die Herstellung der Nanoemulsion bei maximaler Rotorgeschwindigkeit (24 000 UPM) des Homogenisators, mit 2 % PVA als Stabilisator und bei Raumtemperatur. Die Aufreinigung wurde bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 25 000 UPM durchgeführt. Die Charakterisierung der unbeladenen PLGA-Nanopartikel diente als Basis für die Bewertung der mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel.

Unbeladene und unmodifizierte PLGA-Nanopartikel zeigten einen HD von  $234 \pm 14$  nm und eine enge Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,13 \pm 0,02$ ). Der Einsatz von HSA in der wässrigen Phase während der Herstellung führte – vermutlich durch dessen stabilisierende Eigenschaft als amphoterer Tensid – zu PLGA-Nanopartikeln mit einem kleineren HD ( $187 \pm 11$  nm) und einer monodispersen Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,09 \pm 0,01$ ). Die Zugabe von Chitosan in

der wässrigen Phase führte zu größeren Partikeln ( $361 \pm 98$  nm) und einer breiteren Partikelgrößenverteilung ( $PDI\ 0,21 \pm 0,05$ ).

Das Zetapotential lag für PLGA-Nanopartikel bei  $-24 \pm 2$  mV. PLGA-Nanopartikel, welche mit HSA in der wässrigen Phase hergestellt wurden, wiesen ein niedrigeres Zetapotential von  $-15 \pm 1$  mV auf. Wurde Chitosan für die wässrige Phase bei der PLGA-Nanopartikelherstellung verwendet, ergab sich ein positives Zetapotential von  $+17 \pm 6$  mV. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse, sowohl der unbeladenen als auch der beladenen PLGA-Nanopartikel, ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

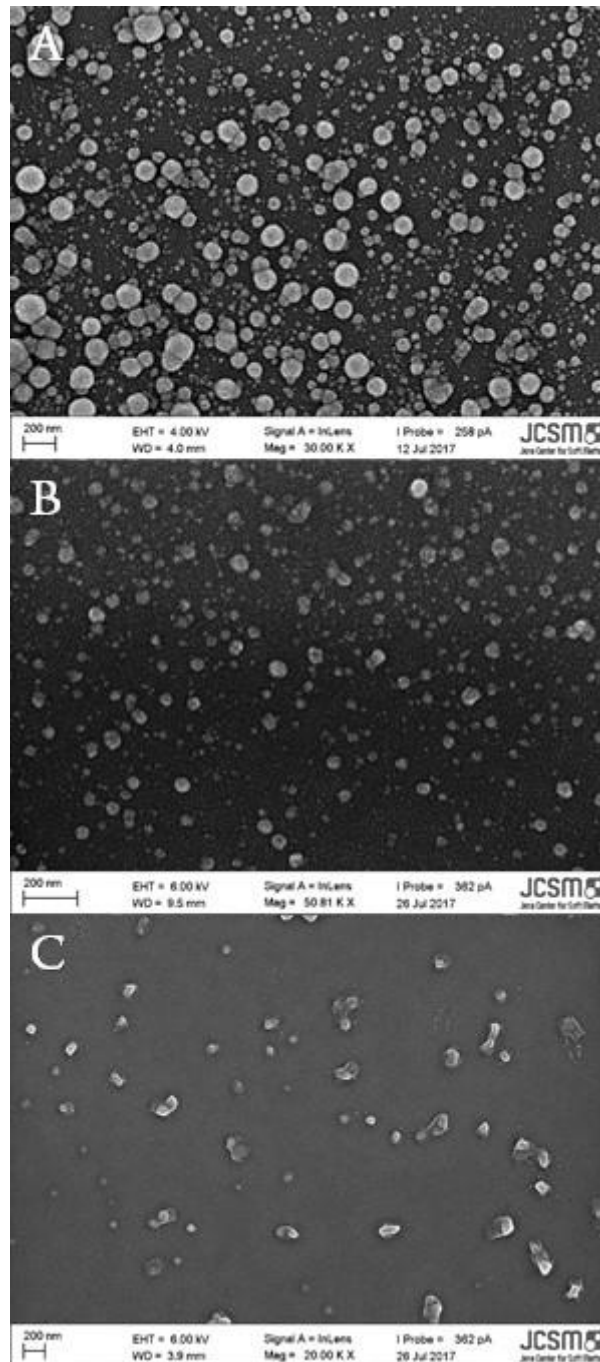
*Tabelle 3-1: Übersicht der hergestellten PLGA-Nanopartikel. Die Nomenklatur der PLGA-Nanopartikel setzt sich aus einem Präfix, einem Wortstamm und einem Suffix zusammen. Der Präfix gibt den beladenen Wirkstoff (Emb  $\triangleq$  Embelin; Ret  $\triangleq$  Retinol) an. Ist kein Präfix vorhanden, handelt es sich um unbeladene PLGA-Nanopartikel. Der Wortstamm beschreibt die PLGA-Matrix der Nanopartikel (PLGA-NP). Das Suffix beschreibt den bei der Herstellung in die wässrige Phase zugesetzten Hilfsstoff (Alb  $\triangleq$  Albumin; Chito  $\triangleq$  Chitosan). Nanopartikel, die unter Ausschluss von Luftsauerstoff und Licht (ALL) hergestellt wurden, sind entsprechend bezeichnet. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Experimente mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und Laser-Doppler-Anemometrie als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.*

Abkürzung	Zusammensetzung		Physikochemische Eigenschaften		
	Wirkstoff	Hilfsstoff	HD [nm]	PDI	ZP [mV]
PLGA-NP	---	---	$234 \pm 14$	$0,13 \pm 0,02$	$-24 \pm 2$
PLGA-NP-Alb	---	Albumin	$187 \pm 11$	$0,09 \pm 0,01$	$-15 \pm 1$
PLGA-NP-Chito	---	Chitosan	$361 \pm 98$	$0,21 \pm 0,05$	$+17 \pm 6$
Emb-PLGA-NP	Embelin	---	$276 \pm 25$	$0,22 \pm 0,01$	$-24 \pm 1$
Emb-PLGA-NP-Alb	Embelin	Albumin	$223 \pm 22$	$0,19 \pm 0,02$	$-19 \pm 3$
Emb-PLGA-NP-Chito	Embelin	Chitosan	$396 \pm 59$	$0,32 \pm 0,10$	$+10 \pm 18$
Ret-PLGA-NP	Retinol	---	$185 \pm 11$	$0,06 \pm 0,01$	$-25 \pm 1$
Ret-PLGA-NP-Alb	Retinol	Albumin	$168 \pm 2$	$0,06 \pm 0,01$	$-17 \pm 1$
Ret-PLGA-NP (ALL)	Retinol	---	$186 \pm 9$	$0,08 \pm 0,02$	$-27 \pm 2$
Ret-PLGA-NP-Alb (ALL)	Retinol	Albumin	$201 \pm 19$	$0,11 \pm 0,03$	$-17 \pm 3$
Ret-PLGA-NP-Chito (ALL)	Retinol	Chitosan	$315 \pm 57$	$0,20 \pm 0,04$	$+3 \pm 8$

### 3.1.4 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Nanopartikel-Morphologie

Die Morphologie und der Durchmesser der PLGA-Nanopartikel wurden mittels REM visualisiert (Abbildung 3-6). Die Durchmesser der Nanopartikel erscheinen in bildgebenden Verfahren kleiner verglichen zu den Durchmessern die durch die Photonenkorrelationsspektroskopie ermittelt wurden, da durch das auf Lichtstreuung basierende Verfahren der hydrodynamische Durchmesser – inklusive der in wässrigen Medien

auf tretende Quellung der PLGA-Matrix – erfasst wird [220]. In Abbildung 3-6 A bis C ist zu sehen, dass die unmodifizierten Nanopartikel, sowie diejenigen mit Chitosan-Modifizierung einen Durchmesser im Größenbereich von 150 nm und eine enge Partikelgrößenverteilung aufwiesen.



**Abbildung 3-6: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der hergestellten PLGA-Nanopartikel.** REM-Aufnahmen von (A) PLGA-Nanopartikeln ohne Modifikation, (B) PLGA-Nanopartikeln mit Albumin-Modifikation und (C) PLGA-Nanopartikeln mit Chitosan-Modifikation.

Den verhältnismäßig kleinsten Durchmesser mit ungefähr 100 nm und einer ebenfalls engen Partikelgrößenverteilung wiesen PLGA-Nanopartikel mit HSA-Modifikation auf. Während die



Form der unmodifizierten sowie der mit Albumin modifizierten PLGA-Nanopartikeln sphärisch scheint, wiesen Partikel mit Chitosan-Modifikation eine zum Teil unregelmäßige Form mit vereinzelt Agglomeraten auf. Die vereinzelt auftretenden Agglomerate der Chitosan-modifizierten Nanopartikel resultierten in einem größeren PDI von  $0,21 \pm 0,05$ . Unmodifizierte und mit HSA-modifizierte PLGA-Nanopartikel zeigten einen PDI von  $0,13 \pm 0,02$  und  $0,09 \pm 0,01$ .

### 3.1.5 Embelin-beladene PLGA-Nanopartikel

#### 3.1.5.1 Physikochemische Charakterisierung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln beladen mit dem lipophilen Naturstoff Embelin als Bestandteil der inneren Phase führte, verglichen zu den entsprechend unbeladenen Nanopartikeln, zu Nanopartikeln mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften bezüglich des HD, PDI und ZP (Tabelle 3-1).

Mit Embelin beladene unmodifizierte PLGA-Nanopartikel zeigten einen HD von  $276 \pm 25$  nm und eine enge Partikelgrößenverteilung (PDI  $0,22 \pm 0,01$ ), vergleichbar zu den entsprechend unbeladenen Partikeln (HD  $234 \pm 14$  nm, PDI  $0,13 \pm 0,02$ ). Beladene und durch Albumin modifizierte PLGA-Nanopartikel zeigten mit einem HD von  $223 \pm 22$  nm und einem PDI von  $0,19 \pm 0,02$  ebenfalls zu den entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikeln ( $187 \pm 11$  nm, PDI  $0,09 \pm 0,01$ ) vergleichbare Eigenschaften. Auch durch Chitosan modifizierte, beladene PLGA-Nanopartikel zeigten einen vergleichbaren HD ( $396 \pm 59$  nm), zu den entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikeln ( $361 \pm 98$  nm, PDI  $0,21 \pm 0,05$ ) und eine enge Partikelgrößenverteilung (PDI  $0,32 \pm 0,1$ ).

Sowohl mit Embelin beladene als auch unbeladene PLGA-Nanopartikel wiesen ein Zetapotential von  $-24 \pm 1$  mV auf. Mit Embelin beladene PLGA-Nanopartikel, die mit Albumin modifiziert wurden, zeigten ein Zetapotential von  $-19 \pm 3$  mV, vergleichbar zu den entsprechend unbeladenen Nanopartikeln. Das Zetapotential von beladenen PLGA-Nanopartikeln die mit Chitosan modifiziert wurden, betrug  $+17 \pm 6$  mV und lag im gleichen Größenbereich wie das der entsprechend unbeladenen Partikel ( $+10 \pm 18$  mV).

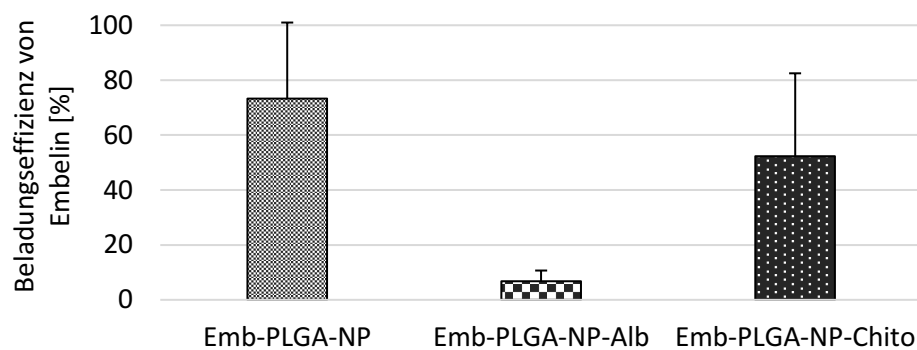
#### 3.1.5.2 Bestimmung der Beladungseffizienz

Die Beladungseffizienz der PLGA-Nanopartikel wurde im Rahmen der Nanopartikelcharakterisierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Dementsprechend wurde eine HPLC-Methode für die Quantifizierung von Embelin



entwickelt. Die Linearität wurde für einen Bereich von 0,1 bis 50 µg/ml, gemäß ICH-Guideline Q2(R1) und mit einem Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) von 0,997 bestimmt und deckte somit alle für die Experimente relevanten Konzentrationen ab [221]. Die Quantifizierung erfolgte beim Absorptionsmaximum von 285 nm. Die Retentionszeit betrug zwischen 8,4 – 8,6 min. Die Selektivität wurde anhand von Matrixproben untersucht. Dazu wurden Proben mit Zellkulturmedium, Caco-2-Zelllysat und PLGA-Nanopartikel nach der Probenaufbereitung (Kapitel 2.3) in die HPLC injiziert und die Auswirkung auf das Chromatogramm untersucht. Basierend darauf wurde das Quantifizierungslimit des Wirkstoffs auf 1 µg/ml festgelegt.

Für die Bestimmung der Beladungseffizienz wurden mit Embelin beladene, unmodifizierte und mit Albumin oder Chitosan modifizierte PLGA-Nanopartikel nach der Gefriertrocknung eingewogen, entsprechend Kapitel 2.3 aufbereitet und mittels HPLC quantifiziert (Abbildung 3-7).



*Abbildung 3-7: **Beladungseffizienz von Embelin in PLGA-Nanopartikeln.** Die Beladungseffizienz wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.*

Die Beladungseffizienz ergab sich aus der tatsächlich beladenen Menge an Embelin im Verhältnis zu der während der Herstellung eingesetzten Menge an Embelin. Wie in Abbildung 3-7 zu sehen ist, zeigte die Beladung von Embelin in PLGA-Nanopartikeln ohne Zusatz von HSA oder Chitosan eine Beladungseffizienz von  $73 \pm 28$  %. Die Schwankungen in der Beladungseffizienz zwischen den einzelnen Versuchen sind vermutlich auf Schwankungen des pH-Wertes zurückzuführen, da während der Herstellung kein Puffer genutzt wurde. Basierend auf der pH-abhängigen Löslichkeit von Embelin durch die zwei konjugierten Carbonsäure-Einheiten, könnte ein niedriger pH-Wert in der äußeren Phase in einer erhöhten Löslichkeit des Embelins resultieren und demzufolge die Beladung beeinflussen. Die Beladungseffizienz von Embelin in Albumin-modifizierten PLGA-Nanopartikeln war mit  $7 \pm 4$  %

am geringsten. Die Beladungseffizienz von Embelin in Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln war mit  $52 \pm 30 \%$  ausreichend, allerdings niedriger als die unmodifizierter PLGA-Nanopartikel. Angesichts der niedrigen Beladungseffizienz von Embelin in Albumin-modifizierten PLGA-Nanopartikeln, wurde der Schwerpunkt in den weiteren Versuchen für Embelin auf unmodifizierte und mit Chitosan modifizierte PLGA-Nanopartikel gelegt.

### 3.1.5.3 In vitro-Freisetzungsverhalten der Embelin-beladenen PLGA-Nanopartikel

Die *in vitro*-Freisetzung von Embelin wurde für verschiedene PLGA-Nanopartikelsysteme (je 1 mg/ml) unter Sink-Bedingungen in phophatgepufferter Lösung (pH 7,4) mit 20 % Ethanol bei 37 °C unter horizontaler Rotation (70 UPM) untersucht. Die gefriergetrockneten Nanopartikel wurden im Freisetzungsmedium dispergiert. Es wurden nach 8 und 12 h Proben gezogen, und im Anschluss die Menge des Wirkstoffes mittels HPLC quantifiziert. Die Summe des Wirkstoffes bei 8 und 12 h wurde relativ zu der eingesetzten Menge an beladenem Embelin gesetzt und in Abbildung 3-8 dargestellt.

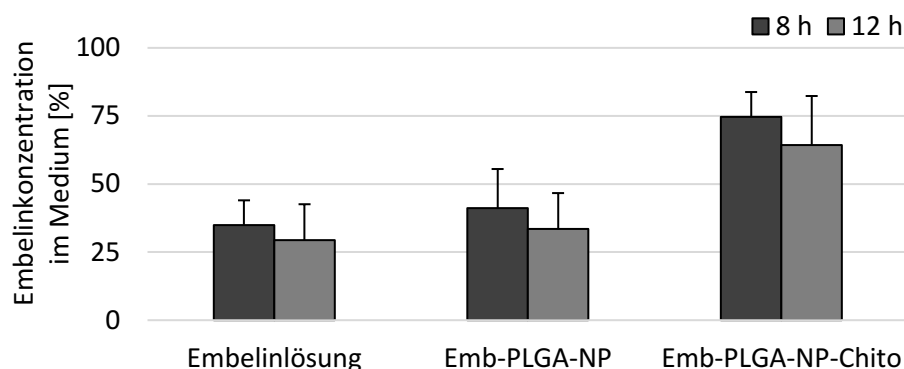


Abbildung 3-8: **Freisetzungsstudie zu Embelin-beladenen PLGA-Nanopartikeln.** Das Diagramm zeigt die Freisetzung von Embelin aus unterschiedlichen PLGA-Nanopartikelsystemen (jeweils 1 mg/ml), verglichen zur Embelinlösung (25 µg/ml). Die freigesetzte Menge an Embelin wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Konzentration an Embelin im Freisetzungsmedium nach 8 h und nach 12 h  $\pm$  Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Wie anhand der Embelinlösung (25 µg/ml) zu sehen ist, erfolgte unter den gewählten Bedingungen ein zeitabhängiger Abbau um 65 % nach 8 h bzw. um 70 % nach 12 h. In unmodifizierte PLGA-Nanopartikel eingeschlossenes Embelin zeigte einen vergleichbaren Abbau (Degradation nach 8 h um  $59 \pm 14 \%$ , bzw. um  $66 \pm 13 \%$  nach 12 h). Die Beladung des Wirkstoffes in Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln schien die Degradation zu verzögern. In diesem Fall betrug die Konzentration im Freisetzungsmedium nach 8 h  $75 \pm 9 \%$  und nach 12 h  $64 \pm 18 \%$ . Da eine Verschiebung des pH-Wertes durch das gepufferte

Freisetzungsmedium ausgeschlossen werden kann, wurde angenommen, dass der Wirkstoff während der Freisetzung hauptsächlich durch Oxidation mit Luftsauerstoff in Kombination mit der erhöhten Temperatur (37 °C) abgebaut wird.

### 3.1.6 Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel

#### 3.1.6.1 Physikochemische Charakterisierung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Unter Standardbedingungen (Kapitel 2.1) wurden unmodifizierte und Albumin-modifizierte Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel hergestellt (Tabelle 3-1).

Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel zeigten im Vergleich zu unbeladenen PLGA-Nanopartikeln (HD  $234 \pm 14$  nm) einen etwas kleineren HD ( $185 \pm 11$  nm) und eine engere Partikelgrößenverteilung (PDI  $0,06 \pm 0,01$ ). Beladene PLGA-Nanopartikel, die mit Albumin modifiziert wurden, zeigten ebenfalls einen kleineren HD mit  $168 \pm 2$  nm gegenüber den entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikeln (HD  $187 \pm 11$  nm) und ebenso eine monodisperse Partikelgrößenverteilung (PDI  $0,06 \pm 0,01$ ). Das Zetapotential von Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln betrug  $-25 \pm 1$  mV und ist vergleichbar zu unbeladenen PLGA-Nanopartikeln (ZP  $-24 \pm 2$  mV). Das Zetapotential von beladenen PLGA-Nanopartikeln mit Albumin-Modifikation betrug  $-17 \pm 1$  mV und ist damit ebenfalls ähnlich zum ZP der entsprechenden unbeladenen Partikel (ZP  $-15 \pm 1$  mV).

Aufgrund der hohen Anfälligkeit von Retinol gegenüber Oxidation wurde für die Beladung von Retinol in PLGA-Nanopartikel eine Herstellungsmethode entwickelt, die die Herstellung unter Ausschluss von Luftsauerstoff und Licht (ALL) ermöglicht (Kapitel 2.1). Wie in Tabelle 3-1 zu sehen ist, führte die Herstellung unter ALL-Bedingungen zu vergleichbaren physikochemischen Eigenschaften bezüglich HD, PDI und ZP.

Die unter ALL-Bedingungen hergestellten unmodifizierten PLGA-Nanopartikel zeigten keine Unterschiede im HD ( $186 \pm 11$  nm) und ebenfalls eine monodisperse Partikelgrößenverteilung (PDI  $0,08 \pm 0,02$ ) verglichen zu denen, die mit der herkömmlichen Methode hergestellt wurden (HD  $185 \pm 9$  nm; PDI  $0,06 \pm 0,01$ ). Die Herstellung von Albumin-modifizierten PLGA-Nanopartikeln unter ALL-Bedingungen führte zu Partikeln mit einem HD von  $201 \pm 19$  nm und einer engen Partikelgrößenverteilung PDI  $0,11 \pm 0,03$ , verglichen zum Pendant unter Standardbedingungen (HD  $168 \pm 2$  nm; PDI  $0,06 \pm 0,01$ ) lagen die hergestellten Partikel im gleichen Größenbereich. Die Herstellung von beladenen Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln erfolgte ausschließlich unter ALL-Bedingungen. Diese Partikel lagen mit einem durchschnittlichen HD von  $315 \pm 57$  nm und einer engen Partikelgrößenverteilung

(PDI  $0,20 \pm 0,04$ ) ebenfalls im gleichen Größenbereich, verglichen zu den entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikeln (HD  $361 \pm 98$  nm; PDI  $0,21 \pm 0,05$ ), die unter Standardbedingungen hergestellt wurden. Insgesamt zeigten beladene gegenüber unbeladenen PLGA-Nanopartikeln unabhängig von der Modifikation einen etwas kleineren HD und eine engere Partikelgrößenverteilung.

Das ZP der beladenen, unmodifizierten PLGA-Nanopartikel die unter ALL-Bedingungen hergestellt wurden betrug  $-27 \pm 2$  mV und unterschied sich damit nicht vom ZP der unter Standardbedingungen hergestellten Partikel (ZP  $-25 \pm 1$  mV). Das ZP der mit Albumin-modifizierten und beladenen PLGA-Nanopartikel, die unter ALL-Bedingungen hergestellt wurden, betrug ebenso wie das der entsprechend unter Standardbedingungen hergestellten Partikel  $-17 \pm 3$  mV. Chitosan-modifizierte, beladene PLGA-Nanopartikel zeigten ein geringeres ZP ( $+3 \pm 8$  mV), verglichen zu den entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikeln (ZP  $+17 \pm 6$  mV). Die ALL-Bedingungen als Ursache für das niedrigere ZP sind eher unwahrscheinlich. Da die wässrige Phase keinen Puffer enthielt, könnte ein niedriger pH-Wert während der Herstellung ursächlich für eine höhere Löslichkeit des Chitosans gewesen sein. Während der Waschschrte wäre dadurch vermehrt Chitosan von der Oberfläche gewaschen worden [103].

Zusammengefasst ist ein Einfluss durch die Herstellung unter ALL-Bedingungen hinsichtlich Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und Oberflächenladung der hergestellten PLGA-Nanopartikel unwahrscheinlich.

#### 3.1.6.2 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der mit Retinol beladenen PLGA-Nanopartikel

Der Durchmesser, die Partikelgrößenverteilung und die Morphologie der Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikel wurden mittels REM und TEM visualisiert (Abbildung 3-9). Die Durchmesser der Nanopartikel erschienen durch die bildgebenden Verfahren auch in diesem Fall kleiner als die, die durch die Photonenkorrelationsspektroskopie ermittelt wurden. Alle Partikel zeigten ein sphärisches gleichmäßiges Erscheinungsbild und eine enge Partikelgrößenverteilung (Abbildung 3-9 A – C). Die Oberfläche erschien für die unmodifizierten PLGA-Nanopartikel gleichmäßig und glatt mit einem Durchmesser im Größenbereich von 100 nm (Abbildung 3-9 D). In Abbildung 3-9 E sind Partikel gezeigt, die während der Herstellung mit Albumin modifiziert wurden. Die mit Chitosan modifizierten Nanopartikel erschienen in den TEM-Aufnahmen dunkel und die Oberfläche schien komplett bedeckt zu sein (Abbildung 3-9 F). Eine dunkle Färbung des Chitosans entsteht durch die

Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Dieses lagert sich in Form eines Komplexes an die Aminogruppen des Chitosans [222].

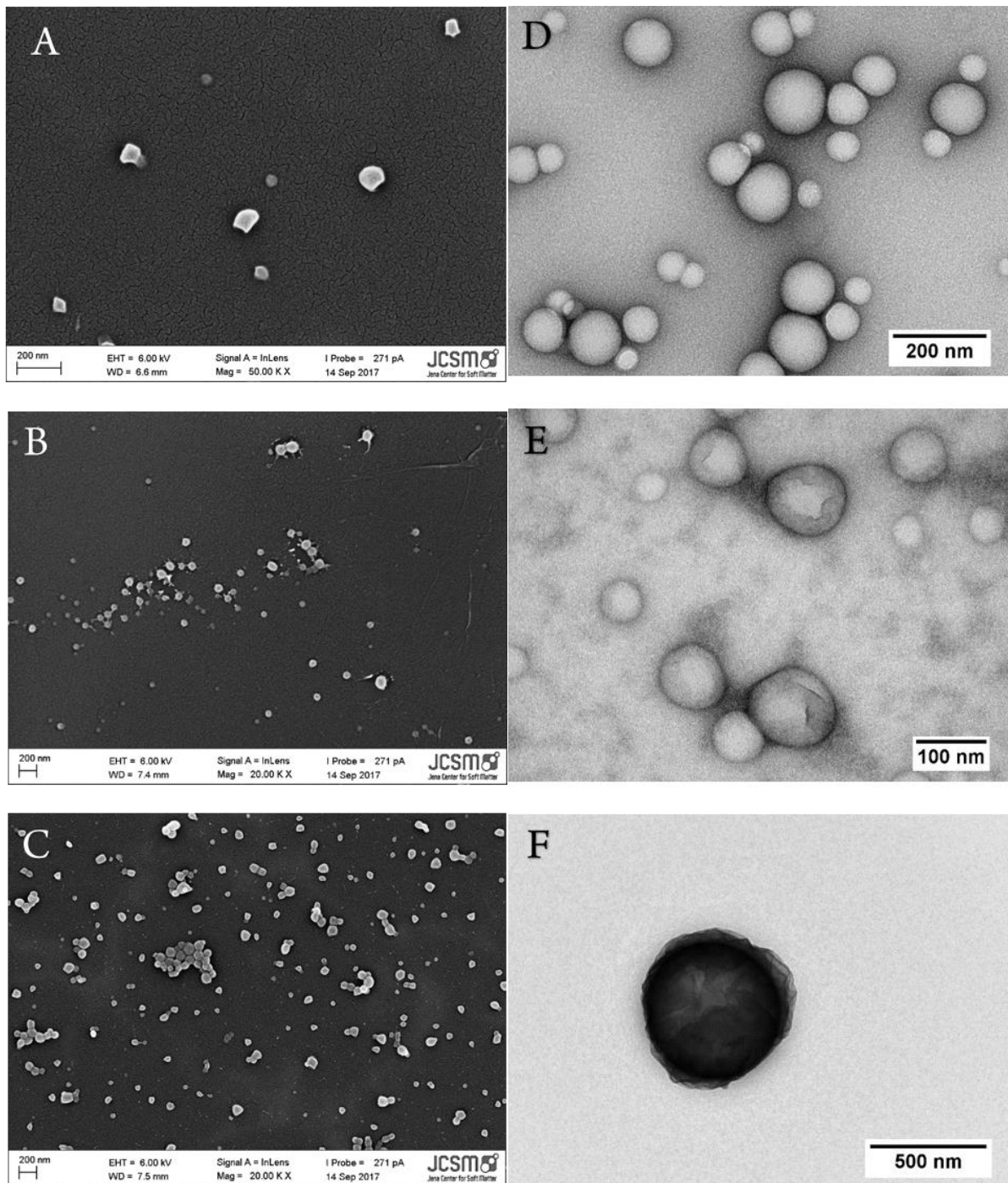


Abbildung 3-9: **Elektronenmikroskopische Charakterisierung der hergestellten Retinol-PLGA-Nanopartikel.** REM-Aufnahmen von (A) Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln ohne Modifikation, (B) Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln mit Albumin-Modifikation und (C) Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln mit Chitosan-Modifikation. TEM-Aufnahmen von (D) Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln ohne Modifikation, (E) Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln mit Albumin-Modifikation und (F) Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln mit Chitosan-Modifikation.



Insgesamt bestätigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Ergebnisse der PCS hinsichtlich physikochemischer Eigenschaften und einer modifizierten Oberfläche durch Albumin bzw. Chitosan.

#### 3.1.6.3 Optimierung der Wirkstoffbeladung

Um die Beladungseffizienz der PLGA-Nanopartikel bestimmen zu können, wurde eine HPLC-Methode für die Quantifizierung von Retinol entwickelt. Die Linearitätsversuche wurden gemäß ICH-Guideline Q2(R1) durchgeführt und es ergab sich ein Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) von 0,999. Die Linearität deckte den für die nachfolgenden Experimente relevanten (0,03 bis 10 µg/ml) Konzentrationsbereich ab [221]. Die Quantifizierung erfolgte beim Absorptionsmaximum von 325 nm. Die Retentionszeit betrug zwischen 6,8 und 7,0 min. Die Selektivität wurde anhand von Matrixproben untersucht. Dazu wurden Proben mit Zellkulturmedium, Caco-2-Zelllysate und PLGA-Nanopartikel nach der Probenaufbereitung (Kapitel 2.3) in die HPLC injiziert und die Auswirkung auf das Chromatogramm untersucht. Basierend darauf wurde das Quantifizierungslimit für Retinol auf 0,1 µg/ml festgelegt.

Um die Nanopartikel-Herstellung unter ALL-Bedingungen gegenüber der herkömmlichen Methode hinsichtlich der Beladungseffizienz von Retinol zu untersuchen, wurde die Beladungseffizienz beider unterschiedlich hergestellter Partikel bestimmt und verglichen. Die Beladungseffizienz ergibt sich aus der tatsächlich beladenen Menge an Retinol im Verhältnis zu der während der Herstellung eingesetzten Menge. Für die folgenden Versuche wurden nicht-modifizierte und durch Albumin modifizierte PLGA-Nanopartikel nach beiden Methoden hergestellt. Die beladene Menge an Retinol wurde anschließend über die Einwaage der gefriergetrockneten Partikel mittels HPLC quantifiziert (Abbildung 3-10).

Aufgrund der Herstellung unter ALL-Bedingungen und den daraus resultierenden reaktionsarmen Bedingungen für oxidationsanfällige Wirkstoffe wie Retinol, ließ sich der Gehalt an beladenem Wirkstoff von  $1,2 \pm 0,3 \%$  (Standard-Bedingungen) auf  $3,4 \pm 0,8 \%$  steigern. Durch den Zusatz von HSA konnte die Beladungseffizienz von  $1,2 \pm 0,3 \%$  auf  $2,8 \pm 0,5 \%$  (unter Standard-Bedingungen) bzw. von  $3,4 \pm 0,8 \%$  auf  $4,3 \pm 0,9 \%$  (unter ALL-Bedingungen) gesteigert werden. Dies bestätigt neben den günstigeren ALL-Bedingungen, den protektiven Mechanismus von Albumin gegenüber Retinol [93]. Die Optimierung der Herstellungsmethode für Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel und die daraus resultierende Kombination aus beiden Schutzmechanismen führte damit zu einer nahezu vierfach höheren Beladungseffizienz von  $1,2 \pm 0,3 \%$  auf  $4,3 \pm 0,9 \%$ .

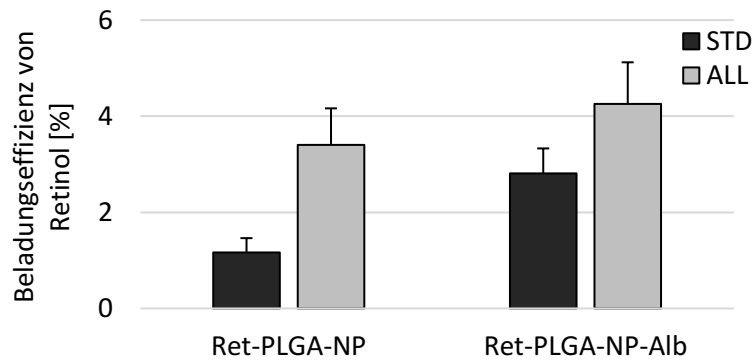


Abbildung 3-10: **Beladungseffizienz von Retinol in PLGA-Nanopartikeln.** Verglichen wurde die Beladungseffizienz unter Standard-Bedingungen (STD) und unter Ausschluss von Licht und Luft-Sauerstoff (ALL). Die Beladungseffizienz wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

#### 3.1.6.4 Photostabilität des verkapselten Retinols

Gefriergetrocknete Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel wurden neben einer ethanolischen Retinollösung (25  $\mu\text{g/ml}$ ) und reinen Retinolkristallen einem Photostabilitätstest entsprechend der ICH-Richtlinie 279/95 mit einer Tageslichtquelle für 24 h bestrahlt [206]. Zudem wurde ein Teil jeder Probe mit Aluminiumfolie umhüllt und ebenfalls der Tageslichtbestrahlung ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben für die HPLC-Analyse entsprechend Kapitel 2.3 aufbereitet und der Gehalt an Retinol ermittelt. Die mit Aluminiumfolie umhüllten Proben dienten für die spätere Auswertung als Referenz für den 100 %-Wert (Negativkontrolle).

Wie in Abbildung 3-11 zu sehen ist, wurde der Gehalt an Retinol bei den Retinolkristallen und der ethanolischen Lösung durch die Lichteinstrahlung in Verbindung mit Luftsauerstoff innerhalb von 24 h auf  $38 \pm 20 \%$  bzw.  $25 \pm 2 \%$  reduziert. Im Vergleich dazu war der Wirkstoffgehalt in den gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikeln deutlich beständiger. Der Gehalt an Retinol verringerte sich innerhalb von 24 h in den gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikeln ohne Modifikation auf  $77 \pm 7 \%$  und in den gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikeln mit Modifikation auf  $70 \pm 6 \%$  (Albumin-modifiziert) bzw.  $78 \pm 6 \%$  (Chitosan-modifiziert).

Basierend auf den Ergebnissen, kann Retinol durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel vor oxidativen Einflüssen durch Licht geschützt werden.

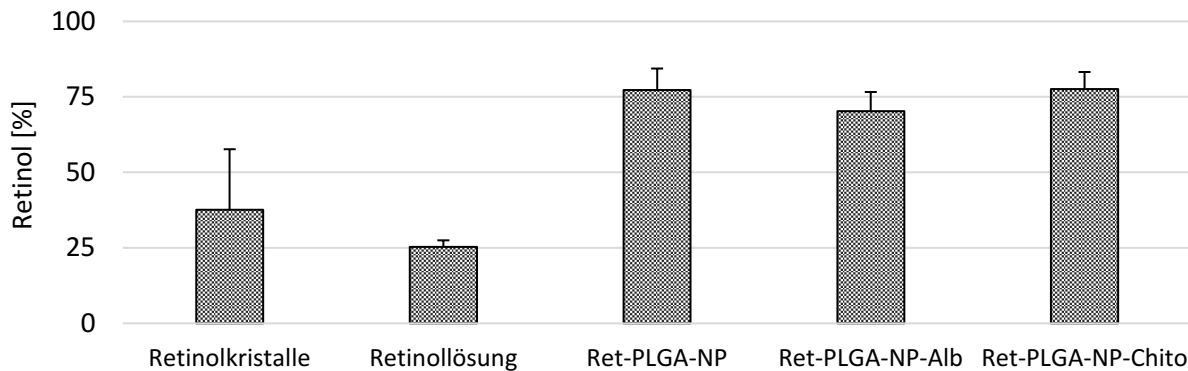


Abbildung 3-11: **Photostabilitätsstudie der hergestellten Retinol-PLGA-Nanopartikel.** Die Abbildung zeigt prozentual für die untersuchten Proben die verbliebene Menge an Retinol, bezogen auf die Referenz. Die Menge an Retinol wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.6.5 In vitro-Freisetzungsverhalten der Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikel

Die gefriergetrockneten PLGA-Nanopartikel wurden im Freisetzungsmedium (PBS mit 20 % Ethanol (V/V), pH 7,4) in einer Konzentration von 1 mg/ml dispergiert und das Freisetzungsverhalten unter Sink-Bedingungen bei horizontaler Rotation (70 UPM) und 37 °C untersucht. Für die Auswertung wurde die mittels HPLC quantifizierte Menge an Retinol aus den Probenzügen nach 8 h und 12 h relativ zu der eingesetzten Menge an beladenem Retinol aufgetragen (Abbildung 3-12).

Unter den gewählten Bedingungen wurde der Gehalt von freiem Retinol welches als Lösung (25 µg/ml) zugegeben wurde, innerhalb von einer Stunde auf  $27 \pm 3$  % reduziert, nach 8 h verblieben noch  $5 \pm 2$  %. Nach 12 h ist nahezu das gesamte Retinol (bis auf  $3,1 \pm 1$  %) abgebaut worden. Die freigesetzte Menge an Retinol bei nicht-modifizierten und mit Chitosan modifizierten PLGA-Nanopartikeln betrug nach 8 h jeweils  $9 \pm 1$  %, und bei PLGA-Nanopartikeln die mit Albumin modifiziert wurden,  $13 \pm 3$  %. Nach 12 h betrug die freigesetzte Menge an Retinol bei nicht-modifizierten PLGA-Nanopartikeln  $7 \pm 1$  %, bei Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln  $9 \pm 2$  % und bei PLGA-Nanopartikeln, die mit Albumin modifiziert wurden,  $10 \pm 2$  %.

Die Ergebnisse bestätigen, zusammen mit den vorangegangenen Untersuchungen, den protektiven Mechanismus der PLGA-Polymermatrix für darin enthaltenes Retinol [223]. PLGA-Nanopartikel, die mit Albumin modifiziert wurden, zeigten, wie bereits unter 3.1.6.3 genannt, einen zusätzlich erhöhten Schutz des Retinols vor Degradation. Alle eingesetzten PLGA-Nanopartikelsysteme zeigten eine gegenüber der Retinollösung überlegene Retinol-Freisetzung über 8 bzw. 12 h.



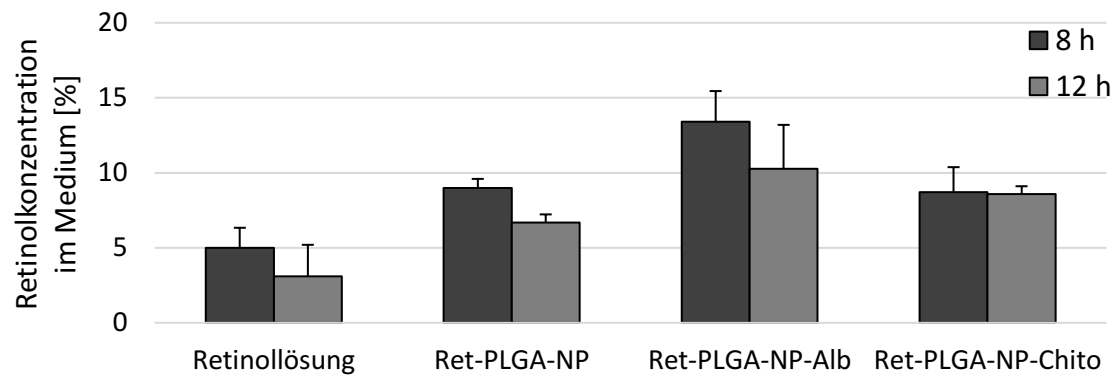


Abbildung 3-12: **Freisetzungsstudie zu Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln.** Das Diagramm zeigt die Freisetzung von Retinol aus unterschiedlichen PLGA-Nanopartikelsystemen (jeweils 1 mg/ml), verglichen zur Retinollösung (25 µg/ml). Die freigesetzte Menge an Retinol wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Konzentration an Retinol im Freisetzungsmedium nach 8 h und nach 12 h  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2 Biokompatibilitätsprofil der entwickelten Wirkstoffträgersysteme

Die Biokompatibilität zwischen Nanopartikeln und Zellen ist eine wesentliche Voraussetzung für *in vitro*-, sowie *in vivo*-Versuche. Zell- und Hämotoxizitätsversuche sind Bestandteil der vorgeschriebenen Einschätzung zur Unbedenklichkeit eines Arzneimittels nach § 1 des Arzneimittelgesetzes (AMG) [224]. Im Sinne der Biokompatibilität sollte neben den üblichen Versuchen zur Zelltoxizität auch die geplante Indikation bzw. Applikationsroute der Formulierung berücksichtigt werden. Beispielweise sollte für eine mögliche Anwendung an entzündetem und geschädigtem Gewebe das Biokompatibilitätsprofil auch die Interaktion mit Blutbestandteilen einschließen, da diese im geschädigten Gewebe auch mit dem applizierten Wirkstoffträgersystem interagieren können. Ferner sollten die besonderen Eigenschaften der Nanopartikel berücksichtigt werden. Basierend auf der großen volumenbezogenen Oberfläche und dem daraus resultierenden hohen Interaktionspotential, ist ein umfassendes und differenziertes Biokompatibilitätsprofil erforderlich um mögliche Risiken einschätzen zu können. Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden nach ISO 10993-5:2009 mit Hilfe des CellTiter-Glo®-Tests durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein Hühnerei-Test an der *Chick-Area-Vasculosa* (HET-CAV) durchgeführt, um dem Biokompatibilitätsprofil für die entwickelten Wirkstoffträgersysteme eine weitere Dimension hinzuzufügen. Letzteres ermöglicht die Untersuchung der Wirkstoffträgersysteme unter dynamischem Blutfluss und kann potentielle Interaktionen detektieren, die unter statischen Bedingungen mit Blutbestandteilen bzw. in Zellversuchen nicht vorkommen könnten [75, 193, 225].

### 3.2.1 Auswertung des CellTiter-Glo®-Assays

Für den CellTiter-Glo®-Assay wurden L929-Mausfibroblasten als Standardzelllinie für Zytotoxizitätsversuche, entsprechend ISO 10993-5:2009 eingesetzt. Die Zellen wurden in 96-Wellplatten transferiert und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mikroskopisch bezüglich zytotoxischer Anzeichen überprüft. Vitale L929-Mausfibroblasten liegen adhärent und spindelförmig mit abgrenzbarer Zellmembran vor. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem CellTiter-Glo®-Reagenz versetzt und das entstehende Lumineszenzsignal spektrophotometrisch ausgewertet. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit einer zytotoxischen 0,02 % (m/V) Thiomersallösung behandelt. Als Negativkontrolle und 100 %-Referenzwert dienten unbehandelte Zellen. Zytotoxizität liegt nach ISO 10993-5:2009 dann vor, wenn die Zellviabilität bezogen auf die Negativkontrolle auf unter 70 % sinkt [226].

Die Stoffwechselaktivität von intakten Zellen ist eng mit der Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) verbunden, da ATP als universeller Energieträger in Zellen fungiert. Um zytotoxische Effekte der PLGA-Nanopartikel zu bestimmen, wurde die ATP-Stoffwechselaktivität der L929-Zellen als Surrogat für deren Zellviabilität quantifiziert. Dabei wurde das vorhandene ATP quantitativ in ein Lumineszenzsignal umgesetzt und spektrophotometrisch vermessen.

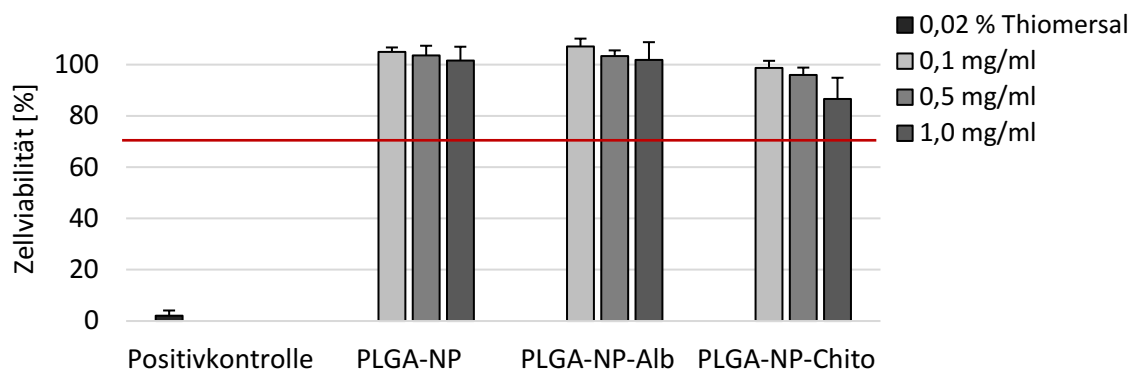
Die Positivkontrolle zeigte nach 24 h Inkubationszeit in allen Versuchen eine vernachlässigbare Zellviabilität von weniger als 3 % und verifiziert somit die korrekte Durchführung der Versuche (Abbildung 3-13 bis Abbildung 3-15). Zusätzlich wurden die Zellen vor und nach der Probenbehandlung qualitativ mittels Lichtmikroskopie bewertet. Ein Ablösen der Zellen, ein vermindertes Wachstum oder eine Veränderung der für L929-Zellen typischen Morphologie können qualitative Anzeichen für eine zytotoxische Wirkung sein [227].

In den durchgeführten Versuchen stimmten die quantitativen Ergebnisse aus dem CellTiter-Glo®-Assay mit denen der qualitativen Beobachtungen überein.

#### 3.2.1.1 Unbeladene PLGA-Nanopartikel

Nach einer Inkubationszeit von 24 h zeigten die L929-Zellen, die mit wirkstofffreien, sowohl unmodifizierten als auch Albumin-modifizierten PLGA-Nanopartikeln inkubiert wurden, eine unverändert hohe Zellviabilität im Bereich von 100 %. Die mit Chitosan modifizierten PLGA-Nanopartikel zeigten konzentrationsabhängig eine verminderte Zellviabilität von

99  $\pm$  3 % (0,1 mg/ml), 96  $\pm$  3 % (0,5 mg/ml) und 87  $\pm$  8 % (1,0 mg/ml). Dennoch lag die Zellviabilität selbst bei der höchsten Konzentration der PLGA-Nanopartikel – die technisch möglich war – deutlich über 70 %. Unter dem Mikroskop zeigten die Zellen nach der Inkubation mit den verschiedenen Nanopartikeln keine Auffälligkeiten. Die Zellen erschienen adhärent und spindelförmig mit abgrenzbarer Zellmembran. Der pH-Wert sowie die Osmolarität blieben von Beginn bis Ende des Versuchs unverändert. Demzufolge können die getesteten Nanopartikel unter den gewählten Bedingungen als verträglich eingestuft werden [56, 57].

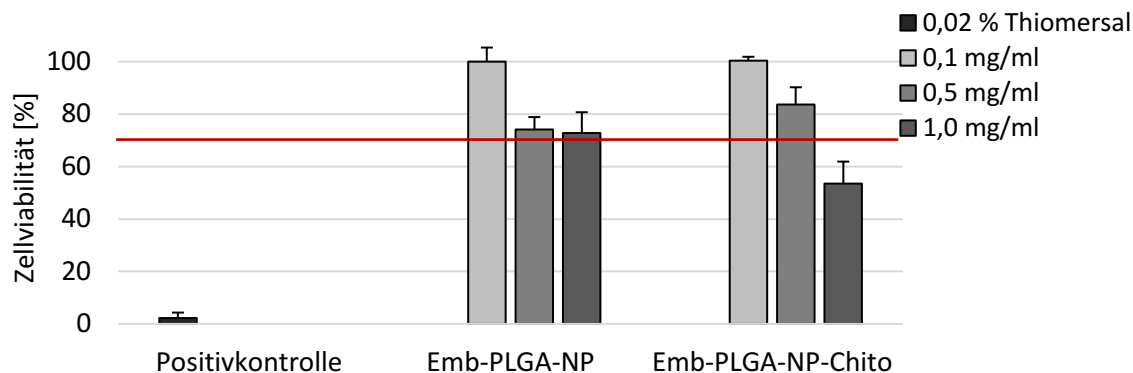


**Abbildung 3-13: *in vitro*-Zytotoxizitätsversuch an L929-Zellen nach 24 h Inkubation mit unbeladenen PLGA-Nanopartikeln mittels CellTiter-Glo®-Assay.** Die Abbildung zeigt die prozentuale Zellviabilität bezogen auf die Negativkontrolle nach 24 h. Die rote Linie markiert die Grenze zur Zytotoxizität bei 70 % Zellviabilität. Die Zellviabilität wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.1.2 Embelin-beladene PLGA-Nanopartikel

Nach 24 h zeigte sich bei Embelin-beladenen unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln konzentrationsabhängig eine verminderte Zellviabilität an L929-Zellen von 100  $\pm$  5 % (0,1 mg/ml), 74  $\pm$  5 % (0,5 mg/ml) und 73  $\pm$  8 % (1,0 mg/ml) (Abbildung 3-14). Nichtsdestotrotz wurde durch die beladenen unmodifizierten PLGA-Nanopartikel bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml die Zellviabilität nicht unter 70 % gesenkt. Beladene PLGA-Nanopartikel, die mit Chitosan modifiziert wurden, zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verminderung der Zellviabilität von L929-Zellen. Während die Zellviabilität bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml (Zellviabilität: 100  $\pm$  2 %) und 0,5 mg/ml (Zellviabilität: 84  $\pm$  6 %) noch jeweils über dem Grenzwert von 70 % lag, fiel diese bei einer Konzentration von 1,0 mg/ml auf 54  $\pm$  8 % und somit in den zytotoxischen Bereich ab. Unter dem Mikroskop zeigten dennoch alle Zellkulturen nach der Inkubation mit den beiden unterschiedlich beladenen Nanopartikeln keine Auffälligkeiten. Die Zellen erschienen adhärent, spindelförmig und mit abgrenzbarer Zellmembran. Der pH-Wert sowie die Osmolarität blieben von Beginn bis Ende des Versuchs

unverändert. Nach ISO 10993-5:2009 können daher die mit Embelin beladenen unmodifizierten PLGA-Nanopartikel bis zu einer Konzentration von 1,0 mg/ml und die entsprechend mit Chitosan modifizierten Nanopartikel bis 0,5 mg/ml unter den gewählten Bedingungen als verträglich eingestuft werden.



**Abbildung 3-14: Konzentrationsabhängiger, in vitro-Zytotoxizitätsversuch an L929-Zellen nach 24 h Inkubation mit Embelin beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels CellTiter-Glo®-Assay.** Die Abbildung zeigt die prozentuale Zellviabilität bezogen auf die Negativkontrolle nach 24 h. Die rote Linie markiert die Grenze zur Zytotoxizität bei 70 % Zellviabilität. Die Zellviabilität wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.1.3 Retinol-beladene PLGA-Nanopartikel

L929-Zellen, die mit Retinol-beladenen unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln inkubiert wurden, zeigten eine Zellviabilität von  $104 \pm 5$  % (0,1 mg/ml),  $100 \pm 7$  % (0,5 mg/ml) und  $92 \pm 9$  % (1,0 mg/ml) nach 24 h (Abbildung 3-15). Die Inkubation mit Albumin-modifizierten PLGA-Nanopartikeln verringerte die Zellviabilität konzentrationsabhängig auf  $101 \pm 9$  % (0,1 mg/ml),  $98 \pm 6$  % (0,5 mg/ml) und  $88 \pm 12$  % (1,0 mg/ml), ebenso wie die Inkubation mit Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln. Letztere führten zu einer Zellviabilität von  $100 \pm 7$  % (0,1 mg/ml),  $91 \pm 10$  % (0,5 mg/ml) und  $84 \pm 10$  % (1,0 mg/ml).

Unter dem Mikroskop zeigten die Zellen nach der Inkubation mit den verschiedenen entsprechenden Nanopartikeln keine Auffälligkeiten. Die Zellen erschienen adhärent, spindelförmig und mit abgrenzbarer Zellmembran. Der pH-Wert sowie die Osmolarität blieben von Beginn bis Ende des Versuchs unverändert. Basierend auf ISO 10993-5:2009 können die untersuchten, mit Retinol beladenen PLGA-Nanopartikel daher unabhängig von der Modifikation unter den gewählten Bedingungen bis zu einer Konzentration von 1,0 mg/ml als verträglich eingestuft werden.

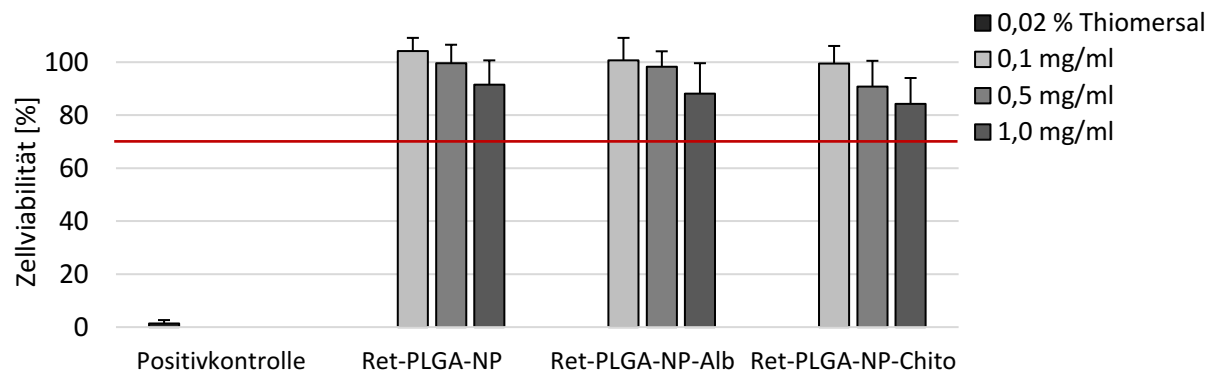
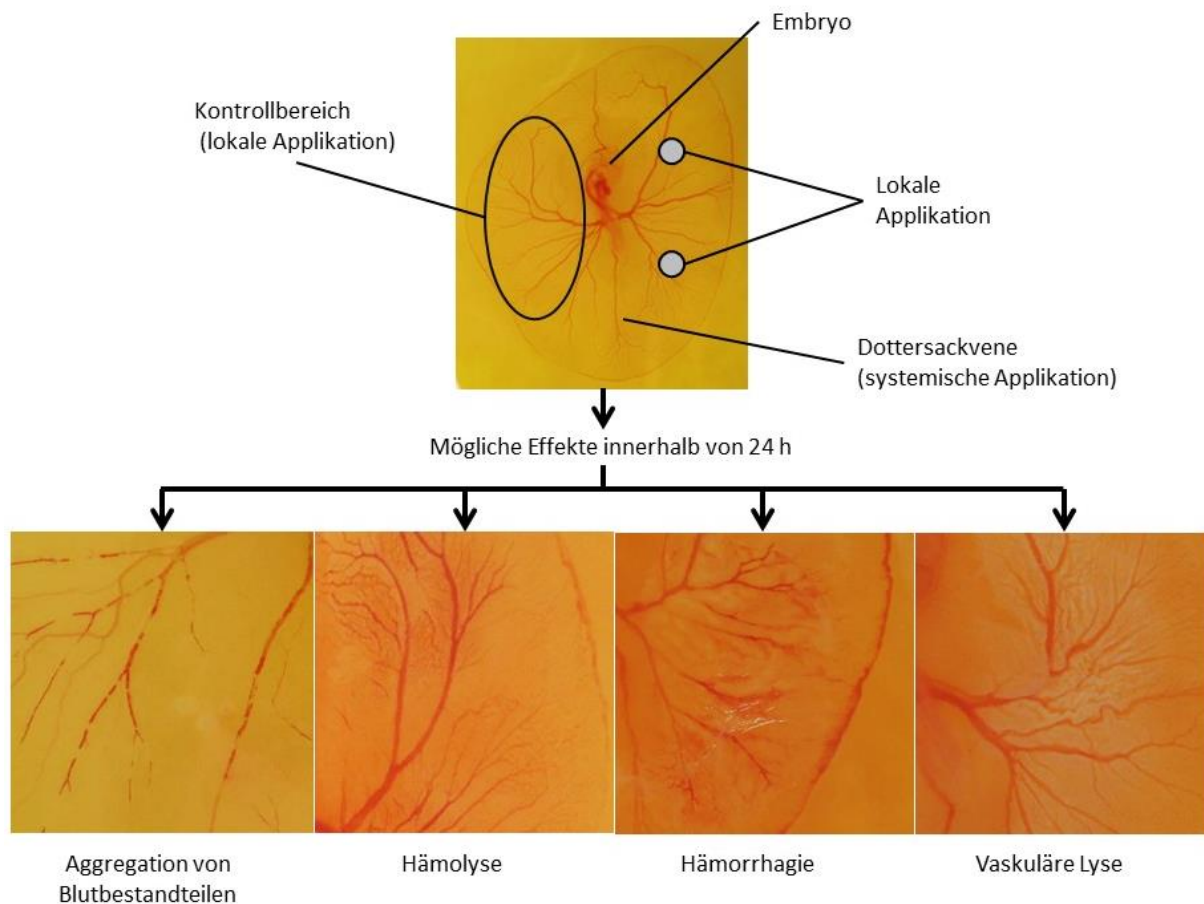


Abbildung 3-15: **Konzentrationsabhängiger, in vitro-Zytotoxizitätsversuch an L929-Zellen nach 24 h Inkubation mit Retinol beladenen PLGA-Nanopartikeln mittels CellTiter-Glo®-Assay.** Die Abbildung zeigt die prozentuale Zellviabilität bezogen auf die Negativkontrolle nach 24 h. Die rote Linie markiert die Grenze zur Zytotoxizität bei 70 % Zellviabilität. Die Zellviabilität wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.2 Der schalenlose Hühnerei-Test an der Chick-Area-Vasculosa

Als Alternative zu Tierversuchen wurde gemäß des 3R-Prinzips in dieser Arbeit der HET-CAV verwendet. Dieser leitet sich aus dem Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM) ab. Beide Testsysteme dienen dazu, toxikologisch bedenkliche Stoffe bzw. Formulierungen auszusortieren, bevor sie in Tierversuchen getestet werden [75, 182]. Der HET-CAV wurde *ex ovo* an bebrüteten Hühnereiern durchgeführt, deren Entwicklungsstadium nach Hamburger & Hamilton mindestens auf 14 kategorisiert wurde [187]. Dies hat den Vorteil, dass neben der Gefäßlyse, Hämorrhagie und Koagulation (beobachtbare Effekte durch den HET-CAM), auch der Stillstand des Herzens und die Reversibilität der Effekte beobachtet werden kann. Ferner konnte für den HET-CAV durch die lokale Applikation von Dimethylsulfoxid (DMSO) Hämolyse als, im Vergleich zum HET-CAM, neuer zu beobachtender Effekt in der Auswertung berücksichtigt werden. Die lokale Applikation der Proben fand nach einer Bebrütungszeit von 72 h statt, die systemische Applikation nach einer Bebrütungszeit von 96 h. Durch die Regenerationsfähigkeit der Blutgefäße wurden unabhängig von der Applikationsroute alle Effekte über 24 h als Maß der Toxizität in folgenden Kategorien beobachtet: Vaskuläre Lyse (VL), Aggregation der Blutbestandteile (A), Hämorrhagie (Hr), Hämolyse (Hl) und Tod durch Stoppen des Herzschlages (T) (Abbildung 3-16).



**Abbildung 3-16: Hühnerei-Test an der Chick-Area-Vasculosa – lokal und systemisch auftretende Effekte.** Die Abbildung zeigt schematisch die Durchführung einer lokalen und systemischen Applikation und Beispiele an Effekten, die zu erwarten sind. Aggregation der Blutbestandteile zeichnen sich durch feste rote Aggregate aus, die sich durch die Blutgefäße bewegen oder diese verschließen. Durch Hämolyse tritt Hämoglobin in die feineren (normalerweise ungefärbten) Kapillaren ein, diese erscheinen daraufhin rot. Hämorrhagie lässt sich durch den diffusen Austritt von Blut aus den Kapillaren erkennen. Eine vaskuläre Lyse ist daran zu erkennen, dass Blutgefäße der CAV zerstört werden, oft ohne Austritt von Blut aus den Gefäßen.

Aufgrund der ethischen Vertretbarkeit wurde die Anzahl an bebrüteten Hühnereiern so gering wie möglich gehalten. Eine versuchsübergreifende Auswertung der Negativkontrolle ergab, dass etwa jedes zehnte Hühnerei unter den gewählten Versuchsbedingungen starb, ohne dass ein äußerer Einfluss ersichtlich war. Daher wurde dies als „*historical value*“ für die Negativkontrolle angenommen.

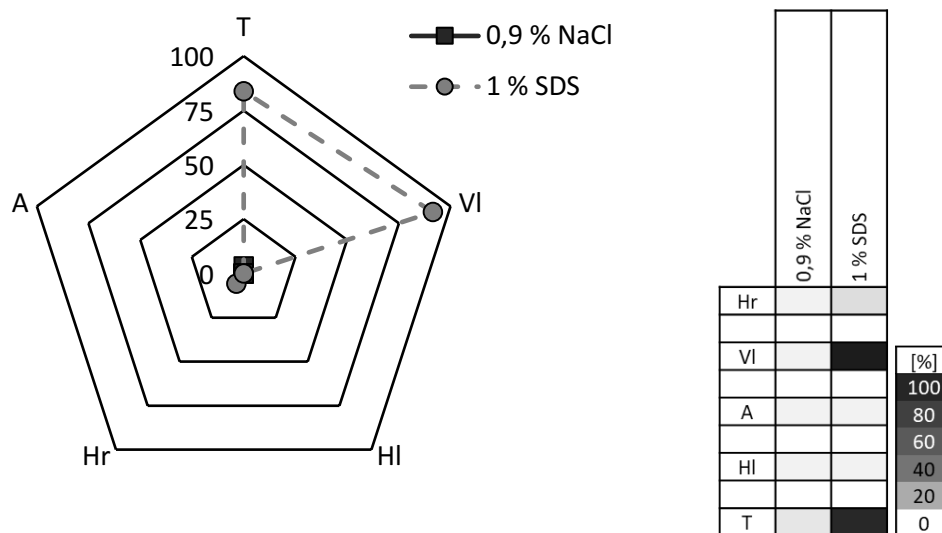
### 3.2.2.1 Methodenentwicklung des HET-CAV für lipophile Substanzen und Trägersysteme

#### 3.2.2.1.1 Lokale Applikation

Um lipophile Wirkstoffe mittels des HET-CAV toxikologisch einschätzen zu können, müssen diese durch Zugabe von Tensiden als Lösungsvermittler oder organischen Lösungsmitteln in Lösung gebracht werden. Eine unzureichende Löslichkeit der Wirkstoffe könnte zur Folge

haben, dass toxikologisch relevante Informationen unentdeckt bleiben. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Interaktion zwischen Wirkstoff und einem Tensid als Lösungsvermittler zu einer Beeinträchtigung der Wirksamkeit des Wirkstoffes führen kann, wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Verwendung organischer Lösungsmittel gelegt. Dementsprechend wurde die Auswirkung gängiger Lösungsmittel für lipophile Substanzen auf die CAV untersucht. Für DMSO, Methanol und Ethanol, welche häufig als Lösungsmittel zum Einsatz kommen, wurde von Gilleron *et al.* in einem modifizierten HET-CAM bereits gezeigt, dass diese in Reinform (100 % Konzentration) Irritationen am Gefäßsystem des Hühnereis auslösen können [185]. Daher wurde für den HET-CAV zuerst die verträgliche Konzentration für diese drei Substanzen als potentielle Lösungsvermittler bestimmt.

Die organischen Lösungsmittel wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (verdünnt in Ringerlösung) lokal aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten Eier, die mit 0,9 % (m/V) Natriumchloridlösung beprobt wurden. Als Positivkontrolle wurde 1 % (m/V) Natriumdodecylsulfatlösung mit einer Pipette lokal appliziert. Aufgrund der Einwirkung des Natriumdodecylsulfats entstanden an der CAV typischerweise eine vaskuläre Lyse und schwere Schleimhautreizungen [228]. Die Positivkontrolle zeigte versuchsübergreifend eine vaskuläre Lyse bei  $91 \pm 5$  % der Eier und eine daraus resultierende Sterberate von  $84 \pm 6$  %.



**Abbildung 3-17: Häufigkeit [%] schädlicher Effekte innerhalb 24 h bei lokaler Applikation der Negativ- und Positivkontrollen im HET-CAV.** Es wurden pro CAV zweimal je 5  $\mu$ l einer 0,9 % (m/V) Natriumchloridlösung bzw. 1 % (m/V) SDS-Lösung lokal appliziert. Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-4).

Das Spinnendiagramm in Abbildung 3-17 dient dazu die Intensität der 5 zu beobachtenden Effekte darzustellen und ermöglicht einen direkten visuellen Vergleich zwischen den



eingesetzten Proben. Im Falle der Positivkontrolle liegt der Schwerpunkt der beobachteten toxikologischen Effekte klar auf der vaskulären Lyse, was in fast allen Fällen in einem Herzstillstand der Eier resultierte.

Die lokale Applikation einer 10 % (V/V) DMSO-Lösung auf die CAV führte innerhalb von 24 h bei  $20 \pm 9$  % der Eier zu einer lokalen vaskulären Lyse und bei  $20 \pm 9$  % der Eier zu einer Hämolyse (Abbildung 3-18).

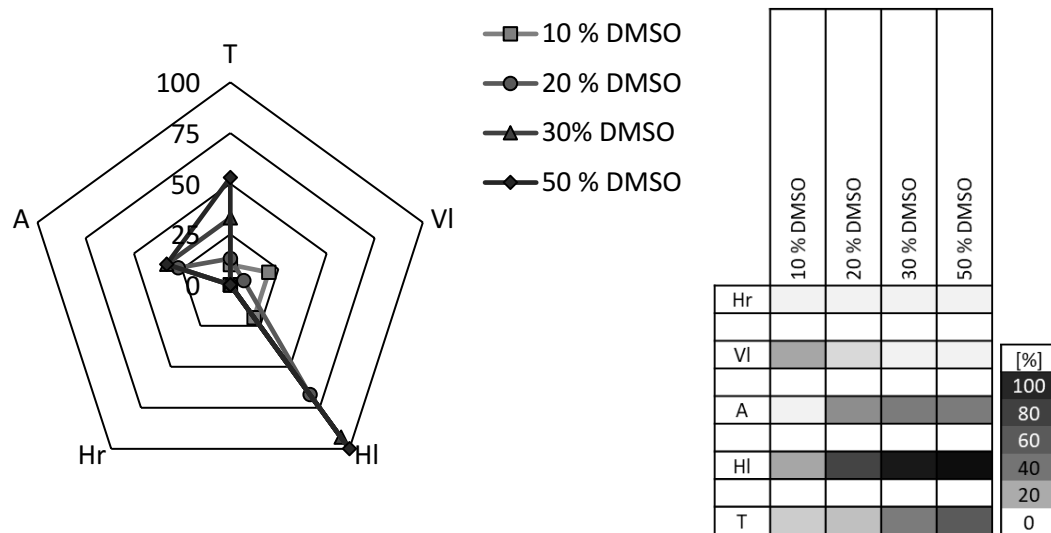
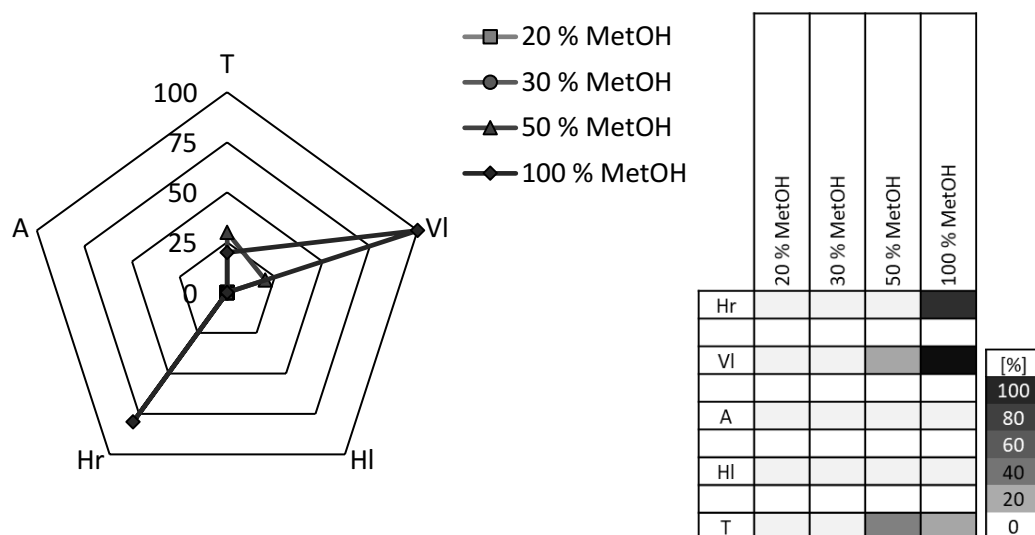


Abbildung 3-18: **Konzentrationsabhängige Häufigkeit [%] schädlicher Effekte innerhalb 24 h bei lokaler Applikation von Dimethylsulfoxid.** Es wurden pro Ei zweimal je 5 µl DMSO in verschiedenen Konzentrationen lokal appliziert. Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-4).

Die Sterberate lag mit  $10 \pm 4$  % auf dem Niveau der Negativkontrolle ( $7 \pm 3$  %). Mit steigender Konzentration an DMSO stieg sowohl die Hämolyse in Intensität und Häufigkeit als auch die Sterberate. Bei einer Konzentration von 20 % (V/V) DMSO wurden bei  $67 \pm 8$  % der Eier Hämolyse und bei  $13 \pm 3$  % ein Stillstand des Herzschlages beobachtet. Eine Konzentration von 30 % bzw. 50 % (V/V) DMSO führte bei fast allen Eiern zur Hämolyse ( $93 \pm 3$  % bzw.  $100 \pm 0$  %) und steigerte die Sterberate der Hühnereier auf  $33 \pm 3$  % bzw.  $53 \pm 11$  %. Eine lokale Applikation von reinem DMSO (nicht gezeigt) führte zur sofortigen lokalen Denaturierung der CAV und zum Herzstillstand bei allen untersuchten Hühnereiern. Durch die im Spinnendiagramm dargestellte Überlagerung der Probelösungen mit verschiedenen Konzentrationen an DMSO ist zu erkennen, dass der Schwerpunkt der schädlichen Effekte im Falle von DMSO konzentrationsabhängig auf der Seite der Hämolyse lag, und je nach Konzentration in einer Aggregation der Blutbestandteile sowie Herzstillstand der Eier resultierte.



Die lokale Applikation einer 20 % oder 30 % (V/V) methanolischen Lösung auf die CAV führte in einem Zeitraum von 24 h zu keinen sichtbaren toxischen Effekten (Abbildung 3-19). Eine 50 % (V/V) methanolische Lösung führte bei  $20 \pm 9$  % der untersuchten Eier zu einer vaskulären Lyse und zu einer Sterberate von  $30 \pm 4$  %. Reines Methanol führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Sterberate ( $20 \pm 9$  %), jedoch zu einer deutlich ausgeprägten vaskulären Lyse bei allen untersuchten Eiern und einer daraus resultierenden Hämorrhagie bei  $80 \pm 9$  % der Eier. Die im Spinnendiagramm dargestellte Überlagerung der Probelösungen zeigt, dass der Schwerpunkt der schädlichen Effekte bis zu einer Konzentration von 50 % (V/V) Methanol auf Seiten der vaskulären Lyse lag und damit vermutlich der ausschlaggebende Faktor für den Herzstillstand der Eier gewesen ist. Erst bei 100 % Methanol traten Hämorrhagien auf, welche die Sterberate nicht weiter erhöhten.



**Abbildung 3-19: Konzentrationsabhängige Häufigkeit [%] schädlicher Effekte innerhalb 24 h bei lokaler Applikation von Methanol.** Es wurden pro Ei zweimal je  $5 \mu\text{l}$  Methanol in verschiedenen Konzentrationen lokal appliziert. Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-4).

Die lokale Applikation einer 20 % (V/V) ethanolischen Lösung führte zu keiner schädlichen Auswirkung an den untersuchten Eiern innerhalb von 24 h (Abbildung 3-20). Die Applikation einer 30 % und 50 % (V/V) ethanolischen Lösung führte bei  $10 \pm 3$  % bzw.  $70 \pm 11$  % der Eier zu einer vaskulären Lyse. Trotz der unterschiedlichen Häufigkeit blieb die Intensität der vaskulären Lyse konstant. Die Sterberate lag jeweils bei  $10 \pm 3$  %. Eine weitere Steigerung der Ethanol-Konzentration auf 70 % (V/V), sowie die lokale Applikation von reinem Ethanol, führten zu einer erhöhten Sterberate von  $20 \pm 9$  % bzw.  $20 \pm 0$  % und einer deutlich ausgeprägten vaskulären Lyse bei fast allen untersuchten Eiern ( $100 \pm 0$  % bzw.  $80 \pm 9$  %). In

Folge einer lokalen Applikation ethanolhaltiger Lösungen über 50 % (V/V) und der dadurch verursachten starken vaskulären Lyse, zeigten mehr als 70 % der Eier Hämorrhagien ( $70 \pm 4$  %,  $100 \pm 0$  % und  $100 \pm 0$  %). Durch die im Spinnendiagramm dargestellte Überlagerung der Probelösungen ist ersichtlich, dass durch Ethanol zwei Schwerpunkte an schädlichen Effekten auftraten (vaskuläre Lyse und Hämorrhagie), die maximal zu einer Sterberate von einem Viertel der Eier führten.

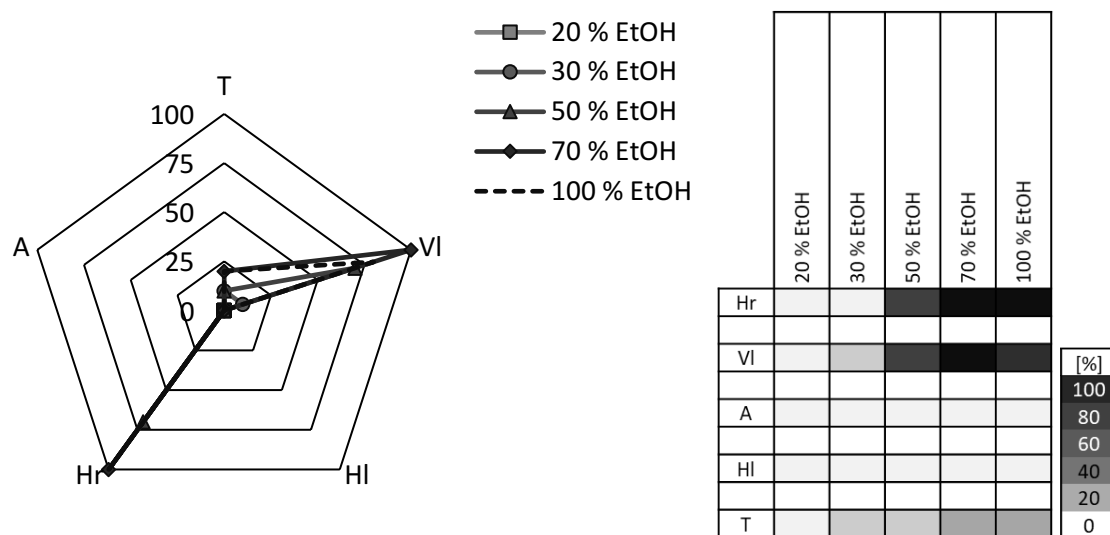


Abbildung 3-20: **Konzentrationsabhängige Häufigkeit [%] schädlicher Effekte innerhalb 24 h bei lokaler Applikation von Ethanol.** Es wurden pro Ei zweimal je  $5 \mu\text{l}$  Ethanol in verschiedenen Konzentrationen lokal appliziert. Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-4).

Für den HET-CAV zeigte sich, dass die Applikation von DMSO konzentrationsabhängig zu den schwerwiegendsten Folgen für die Eier führte. Bereits bei einer Konzentration von 10 % (V/V) traten vaskuläre Lyse und Hämolyse jeweils bei  $20 \pm 9$  % der untersuchten Eier auf. Im Gegensatz dazu führte die Applikation einer methanolischen oder einer ethanolischen Lösung bis zu einer Konzentration von 30 % bzw. 20 % (V/V) zu keinen Irritationen. Daher wurden die zu untersuchenden Naturstoffe (Embelin und Retinol) für die späteren Versuche in 20 % (V/V) Ethanol gelöst (Kapitel 3.2.2.2).

#### 3.2.2.1.2 Systemische Applikation

Aufgrund des kleinen Durchmessers der Dottervene (ca.  $0,5 \text{ mm}$ ) wurde die systemische Applikation mittels feiner Glaskapillare mit einer fest installierten Injektionsapparatur durchgeführt. Hierzu wurde für jede Probe eine Glaskapillare präpariert, die Probe in die Glaskapillare durch Unterdruck aufgezogen, die Spitze der Kapillare mittels Injektionsapparatur in Position gebracht und  $2 \mu\text{l}$  der Probe in die Dottervene injiziert. Um

eine systemische Applikation über die Dottervene durchführen zu können, mit einer möglichst geringen Gefahr einer Embolie oder Verstopfung der feinen Glaskapillare, sollte sich der Wirkstoff bzw. das Trägersystem in Wasser lösen oder fein dispergieren lassen. Im Falle von lipophilen Substanzen werden meist organische Lösungsmittel wie z. B. DMSO, Methanol oder Ethanol verwendet. Diese können die Oberfläche der CAV schädigen und dadurch zu einer Verstopfung der feinen Glaskapillare führen. Aufgrund der runden Spitze der Glaskapillaren war es beim Eindringen in die Membran der CAV daher unvermeidbar, dass organisches Lösungsmittel mit der Membran in Berührung kommt und diese schädigte. Daher wurde die Injektion unter Verwendung dickerer Metallkanülen durchgeführt. Durch die ovale Öffnung der Metallkanüle schneidet zuerst die Spitze der Kanüle einen schmalen Kanal in die Membran, durch die im Anschluss die Probe appliziert werden konnte und sofort vom vorbeifließenden Blut aufgenommen wurde. Durch die verkürzte Kontaktzeit der Probe mit der Membran konnte eine unerwünschte Schädigung der Membran in den meisten Fällen vermieden werden. Eine systemische Applikation von DMSO, Methanol und Ethanol führte an der Einstichstelle zu den bereits für die lokale Applikation beobachteten Reaktionen (Kapitel 3.2.2.1.1). Durch das geringe Injektionsvolumen (2  $\mu$ l) blieben schädliche Effekte lokal auf die Einstichstelle begrenzt und hatten keinen Einfluss auf die Sterberate im Vergleich zu der eingesetzten Negativkontrolle. Als Negativkontrolle diente eine Ringerlösung. Als Positivkontrolle diente eine Lösung mit verzweigtem Polyethylenimin (25 kDa) in einer Konzentration von 25 mg/ml. Die Injektion der Polyethyleniminlösung führte zur sofortigen Aggregation von Blutbestandteilen bei allen Eiern und einer Sterberate von  $97 \pm 2$  % (Abbildung 3-21).

Keines der Lösungsmittel zeigte in einer Konzentration von 50 % (V/V) bei systemischer Applikation nennenswerte schädliche Effekte, abgesehen von der Einstichstelle (Abbildung 3-22).

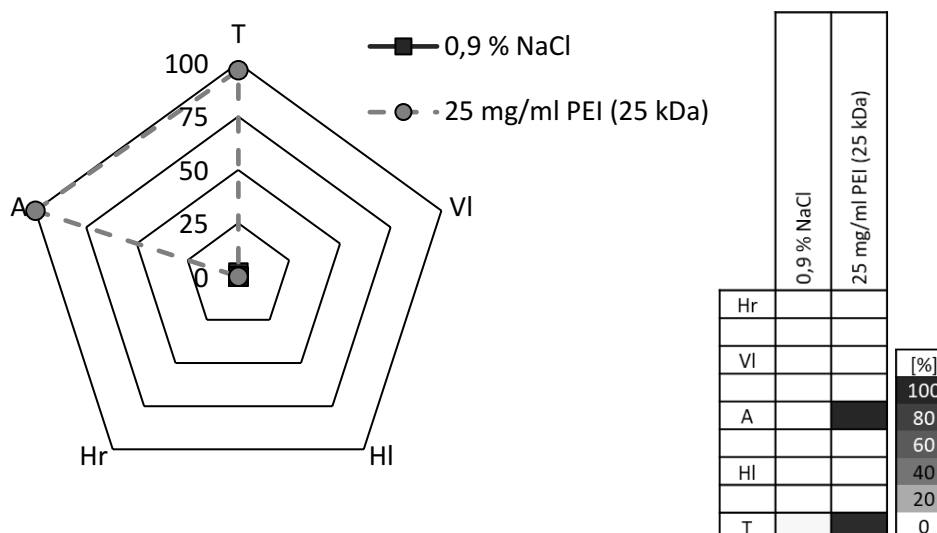


Abbildung 3-21: **Häufigkeit [%] schädlicher Effekte innerhalb 24 h bei systemischer Applikation der Negativ- und Positivkontrollen im HET-CAV.** Es wurden pro Ei 2 µl einer 0,9 % (m/V) Natriumchloridlösung bzw. einer Lösung mit 25 mg/ml verzweigtem Polyethylenimin (PEI) (25 kDa) in die Dottervene injiziert (Kapitel 2.7.2). Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-5).

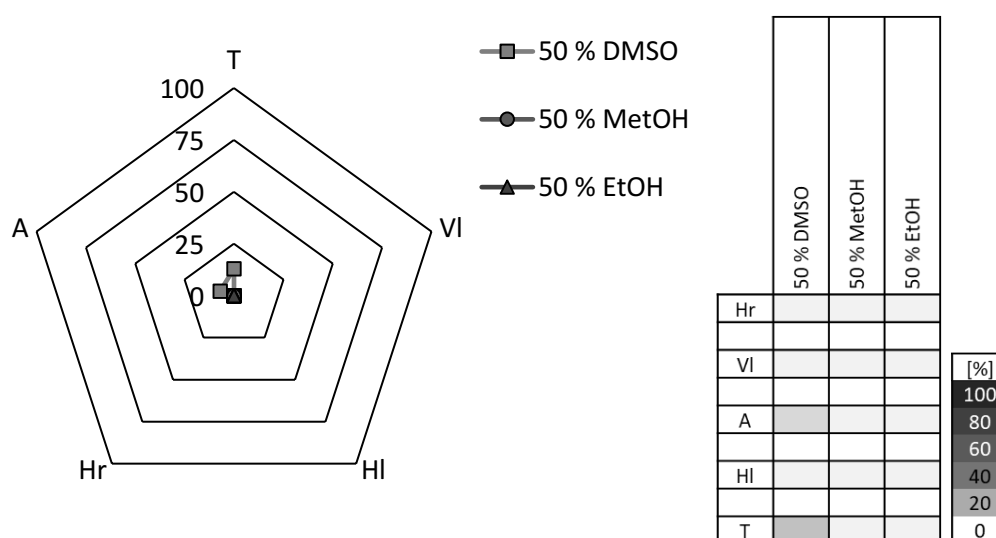


Abbildung 3-22: **Häufigkeit [%] toxischer Effekte innerhalb 24 h bei systemischer Applikation.** Es wurden wässrige Lösungen mit 50 % (V/V) Anteil an DMSO, Methanol oder Ethanol injiziert. Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-5).

### 3.2.2.2 Systemische Applikation der entwickelten Wirkstoffträgersysteme am HET-CAV

Um die beladenen PLGA-Nanopartikel hinsichtlich toxikologischer Interaktionen mit Blutgefäßen bzw. Blutbestandteilen zu untersuchen, wurden diese im schalenlosen Hühnereimodell systemisch appliziert. Durch die offenliegenden Blutgefäße war es möglich das Verhalten der Wirkstoffträgersysteme unter dynamischem Blutfluss zu betrachten. Dadurch wurde das Spektrum an beobachtbaren Interaktionen hinsichtlich toxikologischer Sicherheit erweitert. In diesem Zusammenhang wurden die reinen Naturstoffe (Embelin und Retinol) als 20 % (V/V) ethanolische Lösung in einer Konzentration von jeweils 500  $\mu\text{M}$ , die entsprechend beladenen PLGA-Nanopartikel, sowie deren Modifikationen mit Chitosan oder Albumin untersucht. Für die systemische Applikation wurden die Nanopartikel in Ringerlösung auf die technisch maximal mögliche Konzentration von 1 mg/ml dispergiert, auf 37 °C temperiert und in die Injektionsapparatur geladen. Anschließend wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  der Probelösungen (je 500  $\mu\text{M}$ ) bzw. der Nanopartikeldispersionen (je 1 mg/ml) in die Dottervene injiziert. Als Negativkontrolle diente eine Ringerlösung. Als Positivkontrolle diente eine Lösung mit verzweigtem Polyethylenimin (25 kDa) in einer Konzentration von 25 mg/ml. Die Ergebnisse der systemischen Kontrollen sind in Abbildung 3-21 zusammengefasst.

Unabhängig von der Modifikation und Beladung der Nanopartikel, führte keines der mit Embelin oder Retinol beladenen nanopartikulären Wirkstoffträgersysteme im HET-CAV zu sichtbaren toxikologischen Effekten (Abbildung 3-23 und Abbildung 3-24).

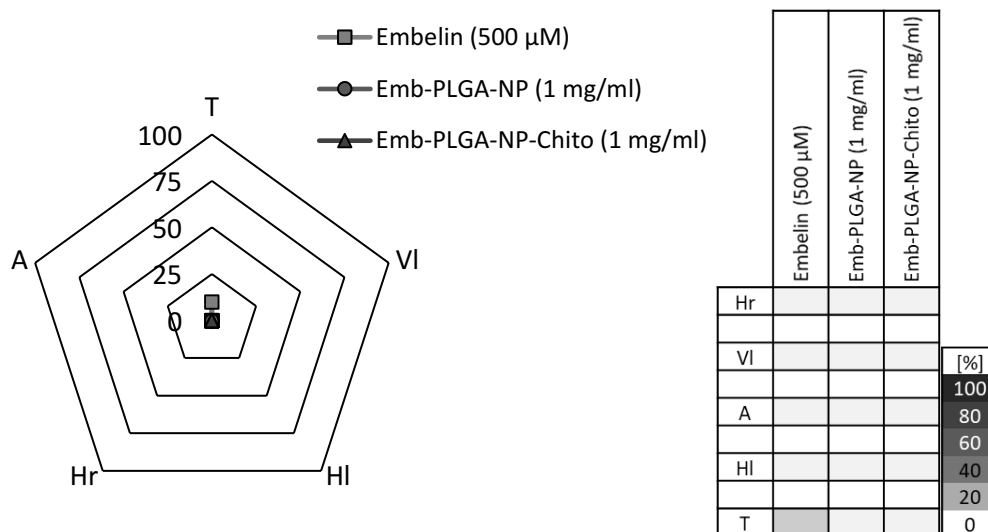


Abbildung 3-23 **Häufigkeit [%] toxischer Effekte innerhalb 24 h bei systemischer Applikation von Embelin und Embelin-beladener Nanopartikel.** Die Probelösungen wurden als 2  $\mu\text{l}$  Einheiten in die Dottervene injiziert (Kapitel 2.7.2). Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-5).

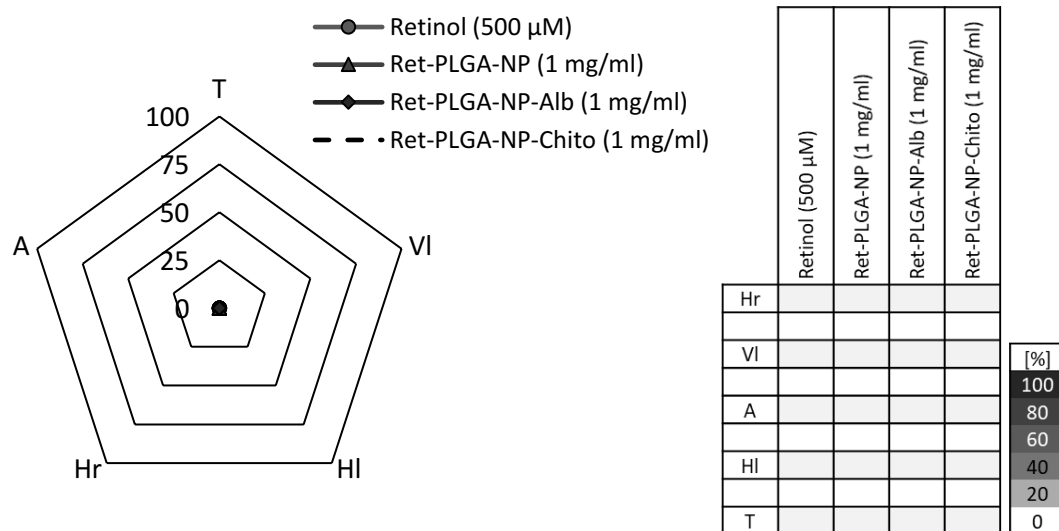


Abbildung 3-24: **Häufigkeit [%] toxischer Effekte innerhalb 24 h bei systemischer Applikation von Retinol und Retinol-beladener Nanopartikel.** Die Probelösungen wurden als 2  $\mu$ l Einheiten in die Dottervene injiziert (Kapitel 2.7.2). Ausgewertete Reaktionen der CAV: Vaskuläre Lyse (VI), Hämolyse (HI), Hämorrhagie (Hr), Aggregation der Blutbestandteile (A) und Herzstillstand des Hühnereis (T). Die Diagramme zeigen die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (Formel 2-5).

Abgesehen von den Schädigungen an der Einstichstelle (höchstwahrscheinlich verursacht durch das organische Lösungsmittel), führte auch keiner der beiden Wirkstoffe zu sichtbaren schädlichen Effekten an der CAV. Die aufgetretene Sterberate von 10 % bei systemischer Applikation der 500  $\mu$ M Embelinlösung liegt im üblichen Größenbereich des *historical value* und kann daher als unspezifisch gewertet werden.

### 3.3 Simulation der intestinalen Wirkstofffreisetzung am Caco-2-Zellmonolayer

Für eine mögliche Anwendung der entwickelten Wirkstoffträgersysteme bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wurde das Caco-2-Zellmodell herangezogen. Es handelt sich um ein Zellmodell mit dem die Permeation von Wirkstoffen bestimmt werden kann [229]. Die Caco-2-Zellen wurden auf Transwells für mindestens 21 Tage inkubiert, bis sich jeweils ein dichter Zellmonolayer mit einem TEER-Wert von mindestens 300  $\Omega/\text{cm}^2$  ausgebildet hat [230, 231]. Neben dem TEER-Wert wurde die Dichtigkeit der Zellmonolayer mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -Dextran überprüft. Die intestinale Freisetzungsstudie wurde dementsprechend an einem intakten Caco-2-Zellmonolayer unter üblichen Inkubationsbedingungen (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchte) und unter Sink-Bedingungen durchgeführt. Die Nanopartikel wurden vor Versuchsbeginn mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg/ml dispergiert und auf 37  $^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Um eine möglichst lange und hohe Wirkstoffkonzentration am Zielort zu erreichen sollte die Freisetzung kontrolliert

lokal auf der luminalen Seite, adsorptiv oder intrazellulär erfolgen. Eine hohe basolaterale Konzentration begünstigt den systemischen Abtransport der Wirkstoffe und ist in diesem Fall unerwünscht. Dementsprechend wurde das Modell dazu genutzt, den Verlust an Wirkstoff über die basolaterale Seite zu bestimmen. Es wurden Proben nach 30 min, nach 1, 2, 4 und 8 h sowohl luminal, als auch basolateral entnommen und die Menge an Embelin mittels HPLC quantifiziert. Nach 8 h wurden die Zellen gewaschen und die Menge an adsorbiertem Wirkstoff im Waschmedium ermittelt. Anschließend wurden die Caco-2-Zellen lysiert, um den intrazellulären Wirkstoffgehalt zu bestimmen.

### 3.3.1 Intestinale Wirkstofffreisetzung von Embelin aus beladenen PLGA-Nanopartikeln

Aufgrund seiner vielseitigen antiinflammatorischen Wirkungen besitzt Embelin ein großes Potential bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. PLGA-Nanopartikel können die Freisetzung von Embelin gezielt beeinflussen und einen Schutz gegenüber vorzeitigem Abbau oder Abtransport bieten. Die im Medium quantifizierte Menge an Wirkstoff wurde relativ zu der eingesetzten Menge (in gelöster Form bzw. in PLGA-Nanopartikel beladen) gesetzt und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 3-25). Aufgrund der Ergebnisse des CellTiter-Glo®-Versuchs wurden für Embelin PLGA-Nanopartikel mit Chitosan-Modifikation als Trägersystem von diesem Zellversuch ausgeschlossen, da diese bei einer Konzentration von 1 mg/ml zu einer verminderten Zellviabilität führten.

Wie in Abbildung 3-25 A ersichtlich, sind unter den gewählten Bedingungen nach 30 min noch  $8 \pm 1$  % des Embelins, das als Wirkstofflösung eingesetzt wurde, im luminalen Medium vorhanden, nach 2 h waren es noch  $6 \pm 1$  %. Im basolateralen Medium fand sich maximal 1 % (Wert nach 1 h) der eingesetzten Menge an Embelin wieder. Daraus lässt sich schließen, dass vermutlich der Großteil des Embelins abgebaut und/oder in die Caco-2-Zellen aufgenommen und/oder an der Zelloberfläche adsorbiert wurde. Im Vergleich dazu ließ sich für beladene PLGA-Nanopartikel nach 30 min mit  $47 \pm 2$  % noch mehr als die fünffache Menge an Embelin im luminalen Medium bestimmen. Nach zwei Stunden waren noch  $17 \pm 4$  % des Wirkstoffes im luminalen Medium vorhanden, bis nach 8 h weniger als 1 % des Embelins wiederzufinden war. Damit lag durch die Beladung des Embelins in PLGA-Nanopartikel die luminal Konzentration des Wirkstoffs in den ersten 4 h deutlich über der der Wirkstofflösung. Der Verlust des Wirkstoffes auf die basolaterale Seite während der gesamten Inkubationszeit betrug weniger als 1 %. Vermutlich wurden neben dem freigesetzten Wirkstoff auch beladene

PLGA-Nanopartikel in die Caco-2-Zellen aufgenommen und/oder an der Zelloberfläche adsorbiert.

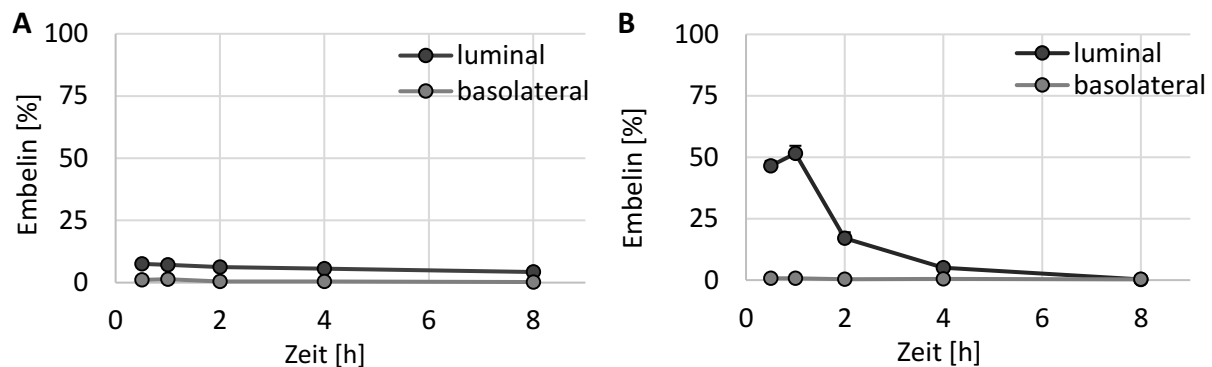


Abbildung 3-25: **Intestinale Wirkstofffreisetzung an Caco-2-Zellen.** Zeitabhängige Veränderung der Konzentration an freiem Embelin auf der luminalen und basolateralen Seite, bezogen auf die eingesetzte Menge an Embelin. (A) Embelin gelöst in Zellkulturmedium (10 µg/ml). (B) Emb-PLGA-NP (1 mg/ml  $\pm$  26,3 µg/ml Embelin). Die Menge an Embelin wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Im Anschluss an die Freisetzungsversuche wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend lysiert. Abbildung 3-26 A zeigt die prozentuale Verteilung an wiedergefundenem Embelin zwischen Medium, Zelloberfläche (entspricht Menge an abgewaschenem Embelin) und Zellinnerem (entspricht Menge an Embelin in den lysierten Zellen) nach 8 h, quantifiziert mittels HPLC. Nach dieser Zeitspanne waren noch 14 % der eingesetzten Menge an Wirkstoff (pro Transwell mit Caco-2-Zellmonolayer) detektierbar. Davon befanden sich etwa ein Drittel (34 %) im Medium und zwei Drittel (64 %) im Caco-2-Zellmonolayer. Die Menge, die an der Caco-2-Zelloberfläche haftete, betrug 1 %. Im Falle von beladenen PLGA-Nanopartikeln wurden nach 8 h etwa 16 % der eingesetzten Menge an Embelin (pro Transwell mit Caco-2-Zellmonolayer) wiedergefunden. Davon fanden sich im Medium etwa 6 % (Abbildung 3-26 B). Der Hauptteil des Embelins befand sich mit insgesamt 94 % entweder an der Oberfläche oder innerhalb des Caco-2-Zellmonolayers. Daher könnten die PLGA-Nanopartikel durch Adsorption an die Oberfläche der Caco-2-Zellen oder durch Aufnahme in die Zellen, die Freisetzung begünstigen haben. Da sich nur ein geringer Anteil des eingesetzten Wirkstoffes (14 % bzw. 16 %) wiederfand, wurde der Großteil vermutlich innerhalb von 8 h abgebaut bzw. von den Caco-2-Zellen metabolisiert. Eine Penetration der PLGA-Nanopartikel über den Caco-2-Zellmonolayer wirkt vor dem Hintergrund einer kaum nachzuweisenden basolateralen Konzentration an Embelin unwahrscheinlich.



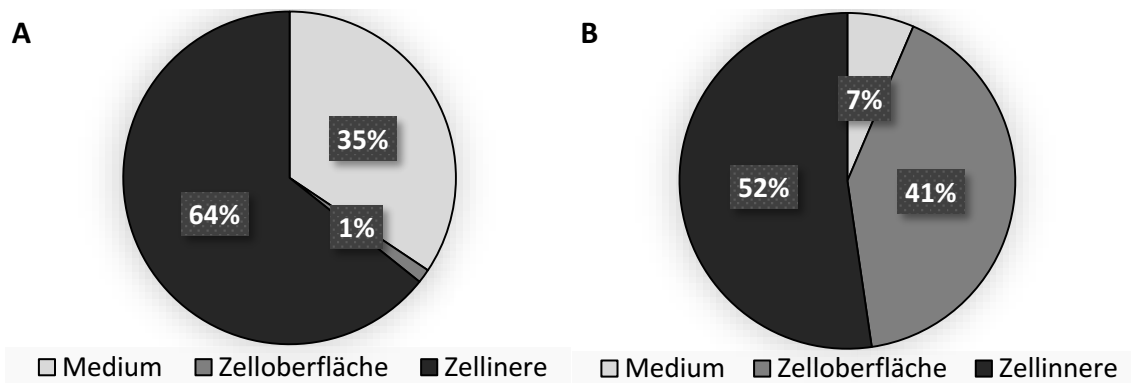


Abbildung 3-26: **Prozentuale Verteilung von Embelin in Caco-2-Zellen nach 8 h.** Der Gehalt an Embelin wurde im ausgewaschenen Medium ( $\triangleq$  Zelloberfläche), in den lysierten Zellen ( $\triangleq$  Zellinnere) und im abgesaugtem Medium (Medium  $\triangleq$  Endkonzentration nach 8 h) quantifiziert. (A) Embelin gelöst in Zellkulturmedium (10  $\mu\text{g/ml}$ ). (B) Emb-PLGA-NP (1 mg/ml  $\triangleq$  26,3  $\mu\text{g/ml}$  Embelin). Die Menge an Embelin wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Um die Integrität des Caco-2-Zellmonolayers zu überprüfen, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) zwischen luminaler und basolateraler Seite gemessen. Üblicherweise liegt der TEER-Wert bei einem intakten Caco-2-Zellmonolayer bei  $> 300 \Omega/\text{cm}^2$  [230, 231]. Wie in Abbildung 3-27 zu sehen ist, wurde der TEER-Wert über den Zeitraum der Freisetzungsstudien weder durch die Zugabe von gelöstem Embelin, noch von den beladenen PLGA-Nanopartikeln verringert.

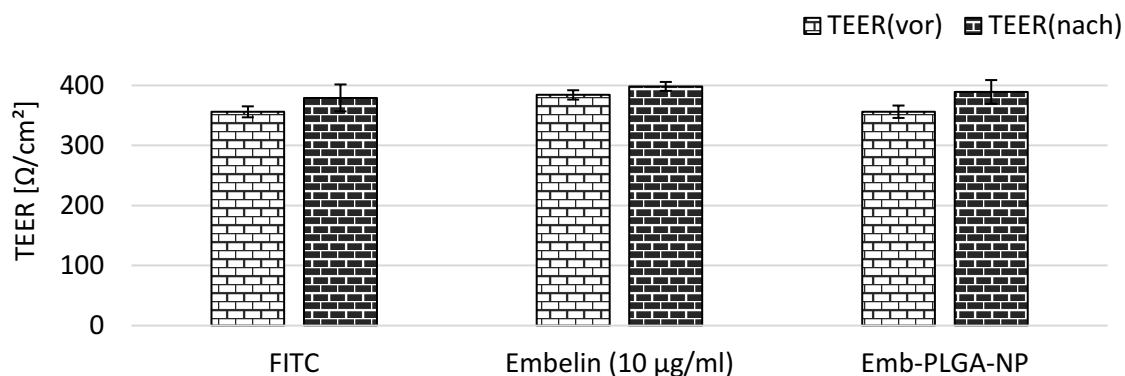


Abbildung 3-27: **Bestimmung des TEER-Wertes vor und nach der Freisetzung an Caco-2-Zellen.** Der TEER-Wert des ausgebildeten Caco-2-Zellmonolayers wurde vor Beginn (TEER(vor)) und nach Ende (TEER(nach)) aller durchgeführten Freisetzungsversuche gemessen. Bei den angegebenen TEER-Werten wurde der Blindwert (TEER-Wert ohne Zellen) bereits abgezogen. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Somit können, in Übereinstimmung mit vorangegangenen toxikologischen Untersuchungen, schädliche Effekte innerhalb von 8 h, die Einfluss auf die Integrität des Caco-2-Zellmonolayers hätten, ausgeschlossen werden. Zusätzlich ergab die Überprüfung des Zellmonolayers in Form einer luminalen Applikation von FITC-Dextran eine Integrität von  $> 99 \%$ .

### 3.3.2 Intestinale Wirkstofffreisetzung von Retinol aus beladenen PLGA-Nanopartikeln

Retinol und seine Metabolite können intestinal durch die Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen in unterschiedlicher Weise das Immunsystem modulieren und dadurch eine entzündungshemmende Wirkung entfalten [177]. PLGA-Nanopartikel können als Transportsystem für Retinol fungieren, um einen Schutz gegenüber vorzeitigem Abbau oder basolateralem Abtransport zu bieten und eine kontrollierte lokale intestinale Freisetzung von Retinol zu ermöglichen. Dazu wurde die im Medium (luminal bzw. basolateral) quantifizierte Menge an Wirkstoff relativ zu der eingesetzten Menge an Retinol (in gelöster Form bzw. in PLGA-Nanopartikel beladen) gesetzt und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 3-28). Wie in Abbildung 3-28 A ersichtlich, wurden nach 30 min über 95 % des Wirkstoffes (als Retinollösung 10 µg/ml) unter den gewählten Bedingungen abgebaut bzw. metabolisiert und/oder an der Zelloberfläche adsorbiert und/oder in die Caco-2-Zellen aufgenommen. Nach 2 h fand sich weniger als 1 % des Wirkstoffes auf der luminalen Seite wieder. Ein Abtransport über die basolaterale Seite ist unwahrscheinlich, da während des Versuchs die Konzentration auf der basolateralen Seite unter 1 % lag (bezogen auf die Menge der Wirkstofflösung). Im Vergleich dazu betrug die freigesetzte Konzentration durch beladene PLGA-Nanopartikel (Ret-PLGA-NP, Ret-PLGA-NP-Alb und Ret-PLGA-NP-Chito) nach 2 h noch 19 – 46 % auf der luminalen Seite (Abbildung 3-28 B, Abbildung 3-28 C und Abbildung 3-28 D). Unmodifizierte PLGA-Nanopartikel setzten nach 30 min  $36 \pm 8$  % des beladenen Retinols auf der luminalen Seite frei. Nach 4 h befanden sich noch  $10 \pm 1$  % und nach 8 h noch  $5 \pm 1$  % des Retinols auf der luminalen Seite. Der Abtransport über die basolateralen Seite innerhalb von 8 h entsprach maximal  $2 \pm 1$  % (Wert nach 4 h) des beladenen Wirkstoffes. Beladene PLGA-Nanopartikel, die mit Albumin modifiziert wurden, führten zu der höchsten Wirkstoffkonzentration im Medium über die gesamte Versuchszeit von 8 h. Erst nach zwei Stunden sank die Konzentration auf unter 50 % ( $46 \pm 6$  %) auf der luminalen Seite. Nach 4 h befanden sich noch  $23 \pm 4$  % und nach 8 h noch  $10 \pm 3$  % des Retinols auf der luminalen Seite. Der Abtransport über die basolaterale Seite innerhalb von 8 h entsprach maximal  $6 \pm 1$  % (Wert nach 8 h) des beladenen Retinols. Beladene PLGA-Nanopartikel, die mit Chitosan modifiziert wurden, setzten nach 30 min  $49 \pm 10$  % des Wirkstoffes frei. Nach 4 h befanden sich noch  $7 \pm 2$  % und nach 8 h noch  $3 \pm 1$  % des Retinols auf der luminalen Seite. Die maximale Wirkstoffkonzentration auf der basolateralen Seite innerhalb von 8 h betrug  $2 \pm 1$  % (Wert nach 4 h) des beladenen Wirkstoffes.

Insgesamt fiel der Abtransport des Retinols über die basolaterale Seite unabhängig von der Art der Nanopartikel gering aus. Ursächlich für die höhere freigesetzte Retinol-Konzentration der PLGA-Nanopartikel im Vergleich zur Retinollösung ist vermutlich eine höhere Stabilität des beladenen Retinols. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der intestinalen Freisetzungsstudie zu Embelin-beladenen PLGA-Nanopartikeln (Kapitel 3.2.1.2). Durch die erhöhte Stabilität von beladenem Retinol, könnten sich PLGA-Nanopartikel für eine kontrollierte lokale Freisetzung von Retinol am Darmepithel eignen und Formulierungen bei denen Retinol in gelöster Form vorliegt überlegen sein.

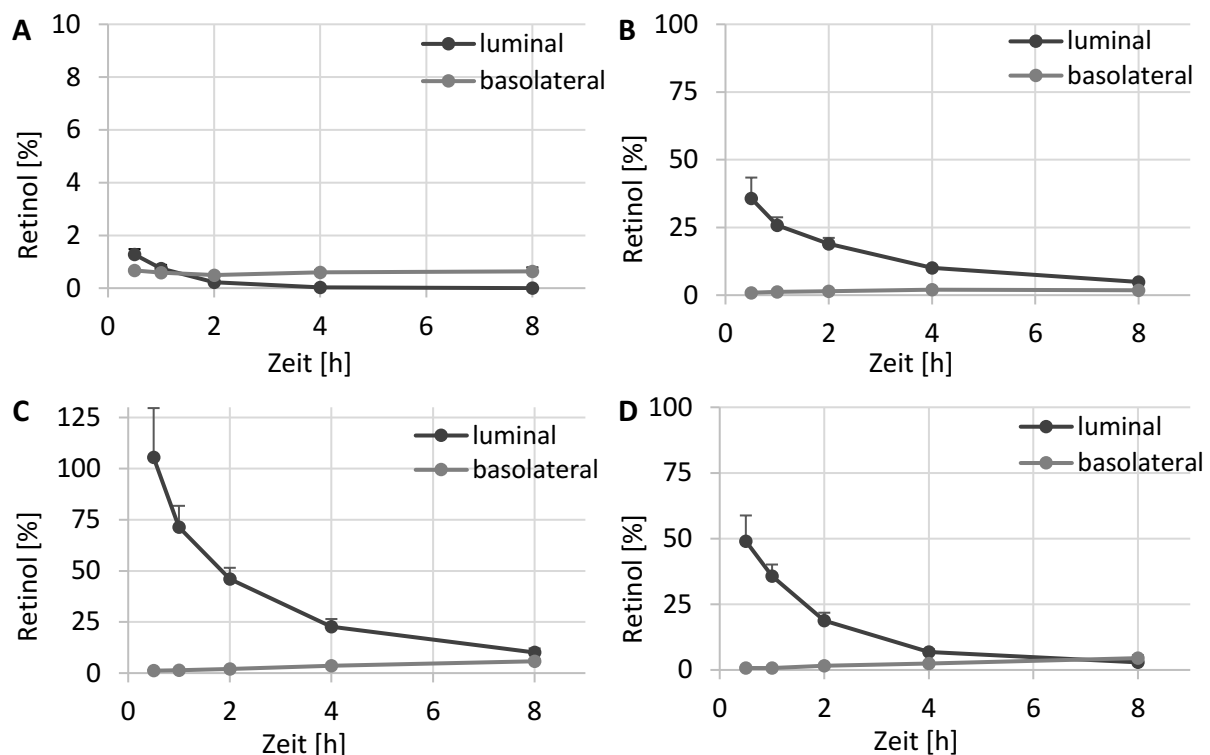
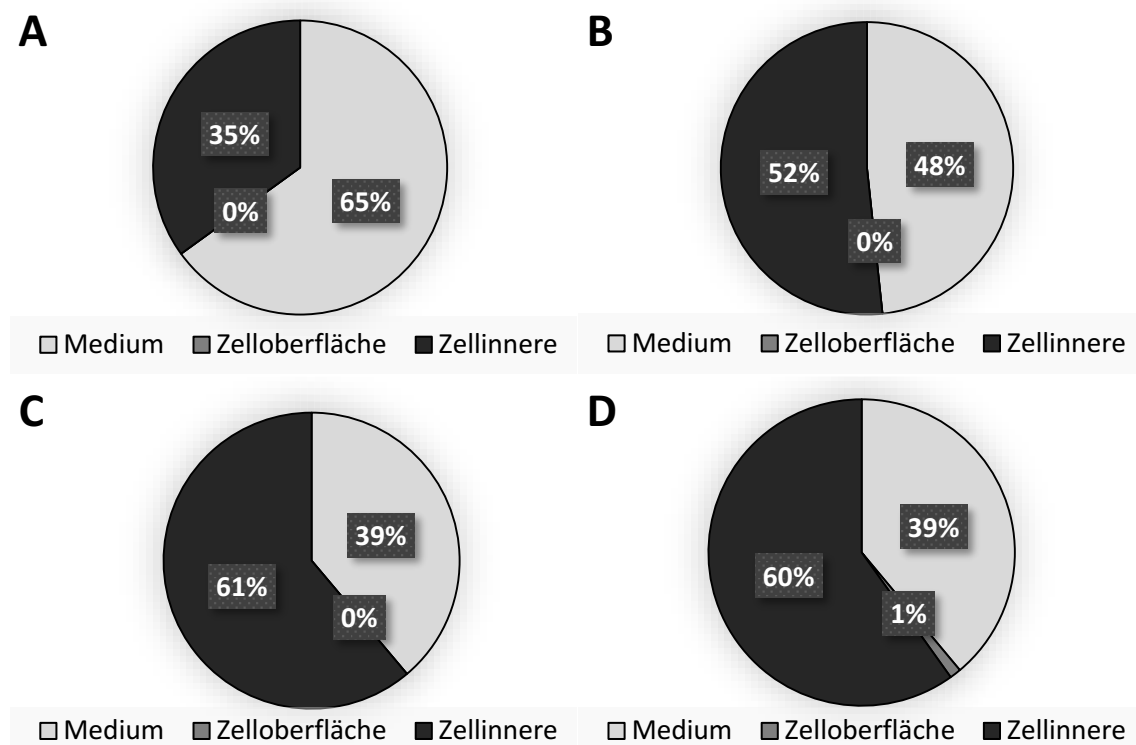


Abbildung 3-28: **Intestinale Wirkstofffreisetzung an Caco-2-Zellen.** Zeitabhängige Veränderung der Konzentration an freiem Retinol auf der luminalen und basolateralen Seite, bezogen auf die eingesetzte Menge an Retinol. (A) Retinolkristalle gelöst in Zellkulturmedium (10 µg/ml). (B) Ret-PLGA-NP (1 mg/ml  $\triangleq$  2,2 µg/ml Retinol). (C) Ret-PLGA-NP-Alb (1 mg/ml  $\triangleq$  2,4 µg/ml). (D) Ret-PLGA-NP-Chito (1 mg/ml  $\triangleq$  3,8 µg/ml). Die Menge an Retinol wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Im Anschluss an die Freisetzungsversuche wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend lysiert. Abbildung 3-29 A zeigt die prozentuale Verteilung an Retinol (Zugabe als Retinollösung 10 µg/ml) nach 8 h. Von den nach 8 h verbleibenden 0,05 µg Retinol fanden sich etwa zwei Drittel im Medium wieder. Die Menge, die oberflächlich an den Caco-2-Zellen haftete und abgewaschen wurde, war in allen Fällen unabhängig vom Wirkstoffträgersystems gering (< 1 %) bzw. nicht nachweisbar. Etwa ein Drittel des Wirkstoffes wurde nach dem

Lysieren der Zellen gefunden. Die gefundene Gesamtmenge nach 8 h war bei allen eingesetzten beladenen PLGA-Nanopartikeln zwischen drei- bis achtfach höher als die der Retinolösung (Ret-PLGA-NP 0,14 µg, Ret-PLGA-NP-Alb: 0,42 µg und Ret-PLGA-NP-Chito: 0,35 µg Retinol, jeweils pro Transwell mit Caco-2-Zellmonolayer). Dies unterstützt die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.6, die ebenfalls auf eine erhöhte Stabilität von Retinol in PLGA-Nanopartikeln deuteten. Der Anteil an intrazellulärem Retinol war unabhängig von der Modifikation für alle PLGA-Nanopartikel höher, verglichen zum freien Wirkstoff (Abbildung 3-29).



**Abbildung 3-29: Prozentuale Verteilung von Retinol in Caco-2-Zellen nach 8 h.** Der Gehalt an Retinol wurde im ausgewaschenen Medium (Zelloberfläche), in den lysierten Zellen (Zellinnere) und im abgesaugtem Medium (Medium  $\triangleq$  Endkonzentration nach 8 h) quantifiziert. (A) Retinolkristalle gelöst in Zellkulturmedium (10 µg/ml). (B) Ret-PLGA-NP (1 mg/ml  $\triangleq$  2,2 µg/ml Retinol). (C) Ret-PLGA-NP-Alb (1 mg/ml  $\triangleq$  2,4 µg/ml). (D) Ret-PLGANP-Chito (1 mg/ml  $\triangleq$  3,8 µg/ml). Die Menge an Retinol wurde mittels HPLC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Ein parazellulärer Transport der PLGA-Nanopartikel ist unwahrscheinlich und wurde vermutlich aufgrund des integren Zellmonolayers durch die *tight junctions* verhindert. Daraus resultierend wurde der Transport von der luminalen auf die basolaterale Seite durch PLGA-Nanopartikel vermutlich verringert und fand hauptsächlich von der luminalen Seite in die Caco-2-Zellen statt, in denen das Retinol wahrscheinlich metabolisiert wurde ohne in

nennenswerter Menge auf die basolaterale Seite transportiert zu werden. Der Anteil an Wirkstoff, der nach dem Lysieren der Zellen gefunden wurde, lag für die applizierte Retinollösung bei etwa 35 % (Abbildung 3-29 A). Im Falle der unmodifizierten PLGA-Nanopartikel lag der Anteil an Retinol, der nach dem Lysieren der Zellen gefunden wurde, bei etwa 52 % und somit deutlich höher, im Vergleich zu der applizierten Retinollösung (Abbildung 3-29 B). PLGA-Nanopartikel, die durch Albumin oder Chitosan modifiziert wurden, zeigten mit einem Anteil zwischen 60 und 61 % die höchste Zellaufnahme von Retinol (Abbildung 3-29 C & D).

Um die Integrität des Caco-2-Zellmonolayers zu überprüfen und eventuell auftretende zytotoxische Effekte zu erkennen, wurde der TEER-Wert zwischen luminaler und basolateraler Seite gemessen. Während des Versuchs lag der TEER-Wert bei über  $300 \Omega/\text{cm}^2$ . Dies entspricht dem erwarteten Wert eines intakten Caco-2-Zellmonolayers [231]. Wie in Abbildung 3-30 zu sehen ist, änderte sich der TEER-Wert während der Freisetzungsversuche nur durch die Applikation der modifizierten PLGA-Nanopartikel um  $22 \Omega/\text{cm}^2$  von  $380 \pm 15 \Omega/\text{cm}^2$  auf  $358 \pm 13 \Omega/\text{cm}^2$  (Ret-PLGA-NP-Alb) und um  $34 \Omega/\text{cm}^2$  von  $373 \pm 14 \Omega/\text{cm}^2$  auf  $339 \pm 29 \Omega/\text{cm}^2$  (Ret-PLGA-NP-Chito). Diese Änderung lag allerdings im Größenbereich der Kontrolle (von  $359 \pm 16 \Omega/\text{cm}^2$  auf  $347 \pm 18 \Omega/\text{cm}^2$ ). Insgesamt lag der TEER-Wert nach Abschluss der Versuche unabhängig von der applizierten Probe in jedem Fall bei über  $300 \Omega/\text{cm}^2$  und wurde zusätzlich mittels luminaler Zugabe von FITC-Dextran bestätigt, indem weniger als 1 % des FITC-Dextrans die basolaterale Seite erreichte (Kapitel 2.6.2; Daten nicht gezeigt).

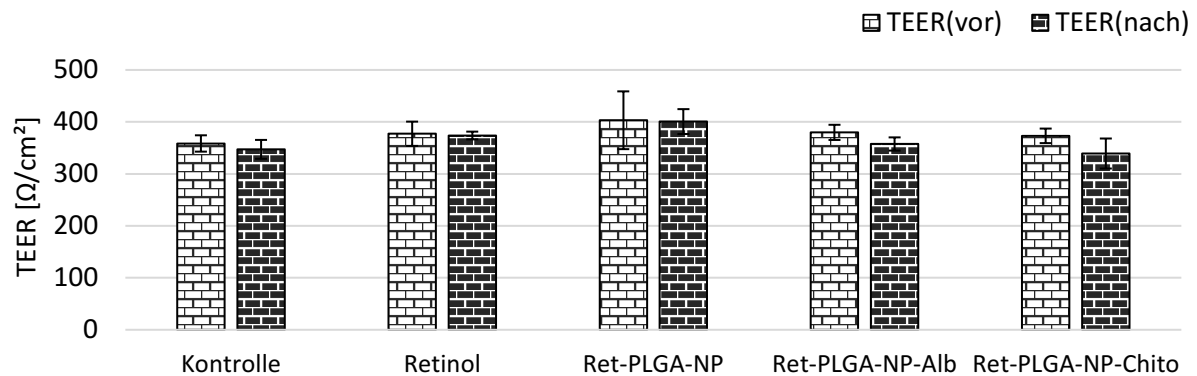


Abbildung 3-30: **Bestimmung der TEER-Werte vor und nach der Freisetzung an Caco-2-Zellen.** Die TEER-Werte der ausgebildeten Caco-2-Zellmonolayer wurden vor Beginn (TEER(vor)) und nach Ende (TEER(nach)) aller durchgeführten Freisetzungsversuche gemessen. Bei den angegebenen TEER-Werten wurde der Blindwert (TEER ohne Zellen) bereits abgezogen. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.4 Antiinflammatorische Aktivität der beladenen PLGA-Nanopartikeln in humanen neutrophilen Granulozyten

Wirkstoffträgersysteme interagieren eng mit dem beladenen Wirkstoff und können die Aktivität des Wirkstoffs beeinträchtigen. Daher ist es unumgänglich die Effizienz des Wirkstoffes in beladenem Zustand zu untersuchen. Als Indikator für die antiinflammatorische Aktivität der eingesetzten Wirkstoffe wurde ein Versuch an neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Neutrophile Granulozyten können das Enzym 5-Lipoxygenase (5-LOX) exprimieren, welches unter anderem als Schlüsselenzym für die Umsetzung von Arachidonsäure zu verschiedenen Leukotrienen dient. Die konzentrationsabhängige Hemmung der 5-LOX-Produktbildung in neutrophilen Granulozyten durch die beladenen PLGA-Nanopartikel, diente als Indikator für die antiinflammatorische Wirkung der untersuchten Wirkstoffträgersysteme und wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Werz durchgeführt. Die gefriergetrockneten Nanopartikel wurden in Zellkulturmedium dispergiert, auf 37 °C erwärmt und zu den humanen neutrophilen Granulozyten gegeben. Die Aktivierung der 5-LOX erfolgte durch Zugabe von Arachidonsäure. Nach 10 min wurde die enzymatische Umsetzung durch Zelllyse mit eisgekühltem Methanol gestoppt. Zileuto, ein etablierter 5-LOX Inhibitor, diente als Inhibitorkontrolle. Als Negativkontrolle diente Ethanol (für die Wirkstofflösungen), bzw. das entsprechend unbeladene Wirkstoffträgersystem. Nach der Probenaufbereitung über eine Festphasenextraktion wurden die gebildeten Produkte der 5-LOX mittels HPLC und internem Standard quantifiziert. Die beobachtete Hemmwirkung wurde auf die beladene Menge an

Wirkstoff je Trägersystem bezogen. Um Nebeneffekte der Wirkstoffträgersysteme zu berücksichtigen, diente das entsprechend unbeladene Trägersystem als 100 %-Referenz.

#### 3.4.1 Antiinflammatorische Aktivität der Embelin-beladenen PLGA-Nanopartikel

Die Hemmwirkung der beladenen PLGA-Nanopartikel wurde jeweils für die Konzentrationen 0,003 mg/ml, 0,01 mg/ml und 0,03 mg/ml untersucht. Schließt man den Beladungsgrad der entsprechenden Chargen mit ein, entspricht dies einem Konzentrationsbereich von 0,5  $\mu$ M bis 5,7  $\mu$ M an Embelin. Wie in Abbildung 3-31 zu sehen ist, wurde die Hemmwirkung des beladenen Embelins auf die 5-LOX über den entsprechenden Konzentrationsbereich durch das Trägersystem nicht beeinträchtigt.

Durch die Zugabe des Wirkstoffes als Lösung wurde bei einer Konzentration von 5,0  $\mu$ M eine Reduzierung der 5-LOX-Produktbildung auf  $70 \pm 7$  % erreicht. Die Inkubation mit den beladenen unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln führte bei der Maximalkonzentration (0,03 mg/ml) zu einer Reduzierung der 5-LOX-Produktbildung auf  $67 \pm 3$  %. Bezogen auf die beladene Menge an Wirkstoff entspricht die Maximalkonzentration 5,7  $\mu$ M. Die Modifizierung der Nanopartikel durch Chitosan steigerte die Effektivität der Hemmwirkung und führte bei der Maximalkonzentration (0,03 mg/ml) zu einer Reduktion der 5-LOX-Produktbildung auf  $59 \pm 3$  %. Bezogen auf die beladene Menge an Wirkstoff entsprechen die 0,03 mg/ml Nanopartikel einer Konzentration von 4,9  $\mu$ M Embelin. Die erhöhte Hemmwirkung der durch Chitosan modifizierten Nanopartikel wurde vermutlich durch eine gesteigerte Interaktion zwischen der positiv geladenen Partikeloberfläche und der negativ geladenen Zelloberfläche verursacht [232]. Eine zytotoxische Beeinträchtigung ist unwahrscheinlich, da als 100 %-Referenz unbeladene mit Chitosan modifizierte PLGA-Nanopartikel eingesetzt wurden. Insgesamt ist ein negativer Einfluss seitens des Wirkstoffträgersystems auf die Wirksamkeit des Embelins daher unwahrscheinlich.

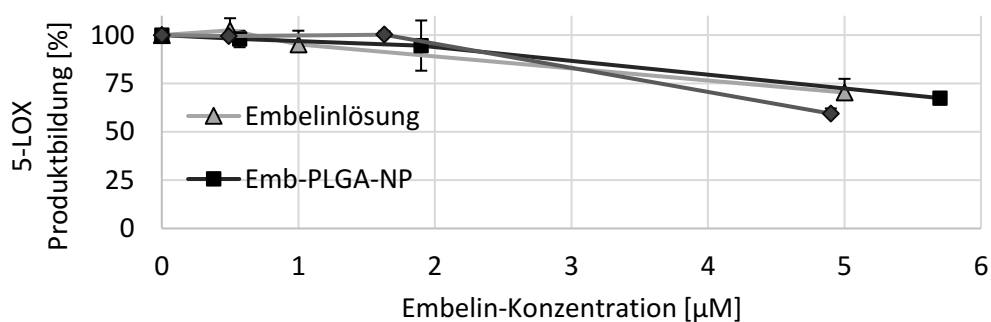


Abbildung 3-31: **Antiinflammatorische Aktivität der hergestellten Embelin-PLGA-Nanopartikel als prozentuale Hemmung der 5-LOX-Produktbildung.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.4.2 Antiinflammatorische Aktivität der Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikel

Die Hemmwirkung der beladenen PLGA-Nanopartikel wurde für die Konzentrationen 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml und 1,0 mg/ml untersucht. Dies entspricht einem Konzentrationsbereich von 1,1  $\mu\text{M}$  bis 23,9  $\mu\text{M}$ , bezogen auf den jeweiligen Beladungsgrad. Durch die Beladung von Retinol in PLGA-Nanopartikel konnte die Hemmwirkung auf die 5-LOX-Produktbildung deutlich gesteigert werden. Die Inkubation mit 1,0 mg/ml der beladenen PLGA-Nanopartikel führte unabhängig von der Modifikation zu einer vollständigen Hemmung der 5-LOX-Produktbildung (Abbildung 3-32). Die  $\text{IC}_{50}$  (inhibitorische Konzentration bei 50 % Hemmwirkung) der Retinollösung lag bei etwa 20  $\mu\text{M}$ . Bezogen auf die beladene Wirkstoffmenge zeigten sowohl unmodifizierte als auch Chitosan-modifizierte PLGA-Nanopartikel eine  $\text{IC}_{50}$  von ungefähr 2  $\mu\text{M}$  Retinol. Beladene PLGA-Nanopartikel, die mit Albumin modifiziert wurden, zeigten eine  $\text{IC}_{50}$  von etwa 4  $\mu\text{M}$  Retinol. Eine zytotoxische Beeinträchtigung der Ergebnisse ist unwahrscheinlich, da als 100 %-Referenz die entsprechend unbeladenen PLGA-Nanopartikel eingesetzt wurden.

Insgesamt konnte die Hemmwirkung (gemessen an der  $\text{IC}_{50}$ ) von Retinol durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel um das fünf- bzw. zehnfache gesteigert werden. Die Ursache hierfür könnte neben der erhöhten Stabilität des beladenen Retinols auch in einer erhöhten Zellaufnahme durch die Nanopartikel begründet liegen [233].

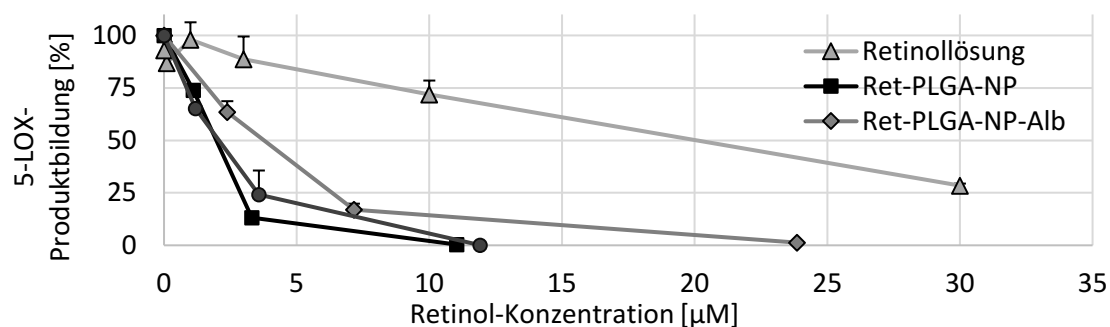


Abbildung 3-32: **Antiinflammatorische Aktivität der hergestellten Retinol-PLGA-Nanopartikel als prozentuale Hemmung der 5-LOX-Produktbildung.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.



## 4 Diskussion

Neue innovative Wirkstoffe mit antiinflammatorischer Wirkung können heutzutage *in silico* durch *Molecular Modeling* entdeckt und entwickelt werden. In der Literatur werden hierzu Online-Plattformen mit riesigen Datenbanken, computergestützte Suchmaschinen für aktuelle Literatur zu innovativen Wirkstoffen und Computerprogramme für die Einpassung von Wirkstoffen an die Zielstruktur nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip beschrieben [234, 235]. Als Ausgangssubstanzen dienen oft Naturstoffe, deren Hemmwirkung im weiteren Verlauf auf bestimmte Zielstrukturen wie die 5-Lipoxygenase (5-LOX), Cyclooxygenase (COX) -2 oder die mikrosomale Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase (mPGES) -1 optimiert wird [236, 237]. Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) -Nanopartikel können die Stabilität und Effektivität von lipophilen Wirkstoffen wie z. B. Methotrexat, Docetaxel oder Nifedipin erhöhen und diese kontrolliert am Zielort freisetzen [238-240]. Häufig lassen sich dadurch auch andere ungünstige Eigenschaften von Wirkstoffen hinsichtlich Lagerung, Selektivität und Toxikologie verbessern [241, 242].

Im Fokus dieser Arbeit standen PLGA-Nanopartikel als innovatives Wirkstoffträgersystem mit einem Durchmesser im Größenbereich von 200 nm, die zum Teil mit Albumin oder Chitosan modifiziert wurden. Ziel war die Beladung mit lipophilen Naturstoffen und deren kontrollierte Freisetzung innerhalb von bis zu 12 h, um als mögliche Therapieoption für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) zu dienen. Als entzündungshemmende Modellsubstanzen standen für diese Arbeit Embelin und Retinol zur Verfügung. Im Rahmen der physikochemischen Charakterisierung der hergestellten PLGA-Nanopartikel wurden Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung und Oberflächenbeschaffenheit per Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), Laser-Doppler-Anemometrie, Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt. Unbeladene und unmodifizierte PLGA-Nanopartikel lagen mit einem HD von  $234 \pm 14$  nm im üblichen Größenbereich, verglichen mit den Ergebnissen anderer Publikationen mit vergleichbarer Herstellungsmethode und Zielstellung [243]. Durch den Einsatz von HSA in der wässrigen Phase konnte der HD – vermutlich durch die stabilisierende Eigenschaft von HSA als amphoterer Tensid – verkleinert werden. Die Zugabe von 0,1 % (m/V) Chitosan in der wässrigen Phase führt nach Chattopadhyay *et al.* zu einer erhöhten dynamischen Viskosität von ungefähr 3 mPa•s [244]. Die erhöhte Viskosität während der Herstellung führte vermutlich zu einem geringeren Krafteintrag und demzufolge zu einer geringeren

Homogenisierungsleistung, was sich in einem größeren HD und einer breiteren Partikelgrößenverteilung zeigte [245, 246].

Das Zetapotential lag für PLGA-Nanopartikel aufgrund der Säure- und Carbonylgruppen des Polymers im Größenbereich von -25 mV [247]. PLGA-Nanopartikel, welche mit HSA in der wässrigen Phase hergestellt wurden, wiesen ein niedrigeres Zetapotential zwischen -15 mV und -20 mV auf, was vermutlich aus den protonierten Aminosäuren und der abgeschirmten PLGA-Oberfläche resultierte [96]. Wurde Chitosan für die wässrige Phase bei der PLGA-Nanopartikelherstellung verwendet, ergab sich ein positives Zetapotential. Das veränderte Zetapotential durch die Zugabe von HSA oder Chitosan während der Herstellung, weist auf eine Modifikation der Oberfläche hin [205, 245].

Um in Gegenwart von Matrixbestandteilen des Trägersystems und Bestandteilen der biologischen Medien eine quantitative Aussage über die Beladungseffizienz der Wirkstoffe treffen zu können, wurde eine neue Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) -Methode entwickelt. Basierend darauf wurden Rückschlüsse auf den Beladungsgrad, die physikochemische Stabilität der Wirkstoffe und das Freisetzungsverhalten getroffen.

Die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln im industriellen Maßstab stellt nach wie vor eine Herausforderung dar, da eine Herstellung im größeren Maßstab oft gravierende Auswirkungen auf die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel haben kann, und die Verwendung von unverträglichen organischen Lösungsmitteln und toxischen Ausgangsmaterialien kritisch sein kann [241, 248]. Die letzten beiden Punkte wurden bereits im Vorfeld durch die getroffene Auswahl der Ausgangsstoffe (PLGA, Polyvinylalkohol, Ethylacetat) berücksichtigt. Um erste Hinweise über die Auswirkungen eines *Upscalings* auf die Herstellungsmethode zu erhalten, wurde im Rahmen der Robustheitsuntersuchungen, im Anschluss zur Methodenoptimierung des unbeladenen Wirkstoffträgersystems, der Maßstab für die Herstellung verdrei- bzw. verfünffacht. Obwohl die Konzentration von gelöstem PLGA in der organischen Phase, sowie das Verhältnis der Volumenanteile von innerer und äußerer Phase nicht verändert wurden, änderte sich die Qualität der hergestellten Nanopartikel in Form einer breiteren Partikelgrößenverteilung und eines durchschnittlich größeren hydrodynamischen Durchmessers (Kapitel 3.1.2.2). Möglicherweise wurde durch das erhöhte Volumen weniger Dispergierungsenergie pro Volumeneinheit in das System übertragen und der geringere Energieeintrag führte dementsprechend zu größeren Partikeln und einer breiteren Partikelgrößenverteilung. Durch eine anschließende Filtration durch

Celluloseacetat-Sterilfilter (Porengröße: 0,22 µm) konnte beides ausgeglichen werden. Celluloseacetatfilter wurden aufgrund ihrer hohen Durchflussrate, niedrigen Adsorptionsrate gegenüber Proteinen und hohen Belastbarkeit für den Einsatz in dieser *Upscaling*-Studie gewählt [249]. Allerdings wurde die Ausbeute der hergestellten Nanopartikel aufgrund der Filtration erheblich gesenkt. Dementsprechend sind die Nanopartikel zwar prinzipiell für eine Filtration geeignet um nach dem Herstellungsprozess die qualitativen Voraussetzungen von Nanopartikeln sicherzustellen, allerdings wird dadurch die Ausbeute auf ein vermutlich unrentables Maß gesenkt. Nichtsdestotrotz könnten die hergestellten PLGA-Nanopartikel dank ihres Durchmessers von unter 220 nm, in einem sterilen Endprodukt resultieren, ohne die komplette Herstellung unter sterilen Bedingungen durchführen zu müssen [250]. Aus der Literatur sind weitere Sterilisationsverfahren für polymerbasierte Nanopartikel, wie z. B. Bestrahlung (mit Gammastrahlen, Röntgenstrahlen oder UV-Strahlen) und Begasung (mit Ethylenoxid, Formaldehyd oder Gasplasma) bekannt. Allerdings können diese Sterilisationsmethoden im Gegensatz zu einer Filtration zu Veränderungen der Polymermatrix oder des Wirkstoffes bezüglich deren physikochemischen und biologischen Eigenschaften führen. Ferner könnte eine Aggregation der Partikel auftreten, welche ein verändertes Freisetzungsverhalten oder ein verändertes toxikologisches Profil zur Folge hätte [251]. Sofern die entsprechenden Nanopartikel filtrierfähig sind und eine ausreichend hohe Ausbeute erreicht wird, ist daher meist die Sterilfiltration das Verfahren der Wahl.

Um das Einsatzgebiet der PLGA-Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem hinsichtlich Freisetzungseigenschaften und Biokompatibilität zu erweitern, wurden diese während der Herstellung durch humanes Serumalbumin (HSA) oder Chitosan modifiziert. HSA macht etwa die Hälfte der Proteinmasse im Blutserum des Menschen aus und steht daher als Interaktionspartner für niedermolekulare Wirkstoffe und Nanopartikel im systemischen Kreislauf zur Verfügung [87]. HSA besitzt eine geringe Toxizität und Immunogenität, ist bioabbaubar und wirkt für einige Wirkstoffe protektiv gegenüber chemischen Abbau [93-95]. Wie von Don *et al.* beschrieben, wird Albumin unter bestimmten Voraussetzungen (z. B. im Entzündungsgeschehen) vermehrt intrazellulär aufgenommen und könnte daher auch die intrazelluläre Aufnahme der PLGA-Nanopartikel begünstigen [98]. Für eine Modifikation von PLGA-Nanopartikeln mit HSA wurde von Manoochchri *et al.* und Dhoke *et al.* bereits eine überlegene Freisetzung und daraus resultierend ein verbessertes Toxizitätsprofil und eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber unmodifizierten PLGA-Nanopartikeln gezeigt [96,

252]. Chitosan eignet sich als Hilfsstoff vor allem für orale Wirkstoffträgersysteme, da es durch eine erhöhte Muko- bzw. Zelladhäsion und einer Anreicherung in Immunzellen, die Verweilzeit im Darmtrakt vor allem bei entzündetem Darmepithel erhöhen kann [106, 113, 114]. Eine Modifikation der PLGA-Nanopartikel mit HSA bzw. Chitosan könnte sich daher hinsichtlich einer gezielten Freisetzung an entzündetem Gewebe als nützlich erweisen. Boting *et al.* berichtete über eine erhöhte Zellaufnahme verbunden mit einer erhöhten Zytotoxizität, die durch eine Modifikation von PLGA-Nanopartikeln mit Chitosan ausgelöst werden könnte [253].

Die Herstellungsmethode wurde im Vorfeld bezüglich der Größe der Nanopartikel und einer engen Partikelgrößenverteilung optimiert (Kapitel 3.1.2.1). Dafür wurden die Rotorgeschwindigkeit des Homogenisators, die Konzentration des Stabilisators, die Temperatur der Emulsion und die Zentrifugationsgeschwindigkeit bei der Aufreinigung angepasst. Diese Parameter werden in der Literatur als besonders kritisch eingeschätzt [254, 255]. Es entstanden PLGA-Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser im Größenbereich von 200 nm, mit Ausnahme der Chitosan-modifizierten Nanopartikel. Diese zeigten unter vergleichbaren Bedingungen einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 300 und 400 nm unabhängig von der Wirkstoffbeladung. Vermutlich wird durch das gelöste Chitosan die Viskosität der wässrigen Phase erhöht und dadurch der Krafteintrag durch das Rührwerkzeug vermindert [244]. Die erhaltenen Ergebnisse sind ähnlich zu denen aus Studien mit vergleichbarer Zielstellung [253, 256]. Alle hergestellten PLGA-Nanopartikel (Methodenentwicklung ausgenommen) zeigten eine enge Partikelgrößenverteilung, unabhängig von der Wirkstoffbeladung und der Modifikation mit Albumin oder Chitosan (Tabelle 3-1). Die Ergebnisse für den Partikeldurchmesser und die Partikelgrößenverteilung wurden über den hydrodynamischen Durchmesser mittels PCS und Laser-Doppler-Anemometrie ermittelt, und mittels REM bestätigt (Kapitel 3.1.4). Die REM-Aufnahmen zeigten insgesamt einen kleineren Durchmesser der PLGA-Nanopartikel, was durch die verschiedenen Messtechniken und durch die Quellung der PLGA-Partikel in wässrigen Medien begründet werden kann [257-259]. Die breitere Partikelgrößenverteilung der Chitosan-modifizierten Nanopartikel, die sich durch einen (im Vergleich zu unmodifizierten Nanopartikeln) erhöhten Polydispersitätsindex (PDI) zeigte, wurde ebenfalls in den REM-Aufnahmen, in denen einzelne Agglomerate zu sehen waren, bestätigt. Die Modifikation der hergestellten PLGA-Nanopartikel durch Chitosan wirkte sich wie erwünscht

auf die Oberfläche der Partikel aus. Zu erkennen war dies an der Veränderung des Zetapotentials. Für unmodifizierte PLGA-Nanopartikel lag das Zetapotential im negativen Bereich zwischen -24 mV und -27 mV. Durch die Chitosan-Modifikation kehrte sich das Zetapotential in den positiven Bereich um, auf +3 mV bis +17 mV. Diese Ergebnisse spiegeln sich in der Literatur wieder, Beobachtungen von Boting *et al.* zeigten einen Umschlag des Zetapotentials von -21 mV (für unmodifizierte PLGA-Nanopartikel) auf +10 bis +26 mV (für PLGA-Nanopartikel mit Chitosan-Modifikation) [253]. Ferner wurden die Nanopartikel mittels TEM dargestellt und zeigten eine typische dunkle Einfärbung des Chitosans an der Oberfläche [222]. Eine Modifikation durch Albumin wirkte sich weniger deutlich auf die Oberfläche der PLGA-Nanopartikel aus. Durch dessen amphotere Eigenschaften sank das Zetapotential auf einen Bereich zwischen -15 mV bis -19 mV, die Oberfläche der modifizierten Nanopartikel erschien in den TEM-Aufnahmen ähnlich verglichen zu der der unmodifizierten Nanopartikel [260].

Während die Beladung der Nanopartikel mit Embelin bzw. Retinol keinen relevanten Einfluss auf die Partikelgröße, die Partikelgrößenverteilung oder das Zetapotential zeigte, führten beide Modifikationen der Nanopartikel-Herstellung – mit Albumin bzw. Chitosan – zu wesentlichen Veränderungen der Beladungseffizienz. Bei der Beladung der PLGA-Nanopartikel mit Embelin wurde eine Beladungseffizienz von mehr als 70 % erreicht. Die Zugabe von Albumin oder Chitosan in die wässrige Phase während der Herstellung führte zu einer Senkung der Beladungseffizienz auf unter 10 % bzw. auf rund 50 %. Die etwas niedrigere Beladungseffizienz im Falle der Chitosan-Modifikation ist vermutlich der zusätzlichen Masse an Chitosan geschuldet, und könnte zu einer leichten Verzerrung der Gesamtmasse geführt haben. Durch die Zugabe von Albumin während der Herstellung wurde Embelin vermutlich an dieses gebunden, Yeggoni *et al.* ermittelte eine hohe Bindungskonstante von  $5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  zwischen Embelin und Albumin [155]. Vermutlich verblieb der Wirkstoff daher hauptsächlich in der wässrigen Phase und wurde bei der Aufreinigung eliminiert, was zu einer geringen Beladungseffizienz (< 10 %) geführt hat. In diesem Fall konkurriert Albumin anscheinend als Bindungspartner zu PLGA und führte dazu, dass weniger Embelin in der organischen Phase verblieb und dementsprechend weniger Wirkstoff verkapselt werden konnte. Um dies zu bestätigen, wären weitere Versuche zur Untersuchung der Bindungsaffinität zwischen Embelin und PLGA notwendig.

Die Bindungsaffinität zwischen Albumin und Wirkstoff wirkte sich jedoch nicht immer nachteilig auf die Beladungseffizienz aus. Albumin kann als zusätzlicher Bindungspartner die Beladungskapazität auch erhöhen [96]. Eine Beladung von Retinol in unmodifizierte PLGA-Nanopartikel führte aufgrund der chemischen Anfälligkeit von Retinol zu einer Beladungseffizienz von  $1 \pm 0,3 \%$  [261]. Die Modifikation mit Albumin führte in diesem Fall zu einer dreifach höheren Beladungseffizienz ( $3 \pm 0,5 \%$ ), trotz einer hohen Bindungskonstante zwischen Retinol und Albumin ( $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) [262]. Vermutlich wird die Bindungskonkurrenz des Albumins – resultierend in einem hohen Wirkstoffverlust beim Auswaschen – durch die erhöhte Stabilität des Retinol-Albumin Komplexes überlagert [93]. Aufgrund der hohen Anfälligkeit von Retinol gegenüber Oxidation wurde ein innovatives Herstellungsverfahren entwickelt, das den Ausschluss von Licht und Luftsauerstoff (ALL) ermöglicht. Die unter ALL hergestellten Nanopartikel zeigten eine Beladungseffizienz von bis zu 4 %. Anschließende Versuche zur Photostabilität zeigten die überlegene Resistenz von Retinol in PLGA-Nanopartikeln gegenüber Retinolkristallen, sowie Retinol in ethanolischer Lösung. Während in bisherigen Studien Retinol vor allem kovalent gebunden oder in flüssiger und halbfester Darreichungsform (z. B. Emulsionen, ölige Lösungen, Cremes) formuliert wurde, ist dies nach besten Wissen die erste Studie über die Herstellung von lyophilisierten, mit Retinol beladenen, soliden PLGA-Nanopartikeln im Größenbereich von 200 nm und monodisperser Partikelgrößenverteilung ( $\text{PDI} < 0,1$ ) [263]. Nichtsdestotrotz wäre zu prüfen ob man in weiterführenden Versuchen die Verkapselungseffizienz durch Zusatz von Antioxidantien oder der Herstellung bei niedrigen Temperaturen weiter steigern kann.

Die Freisetzungsstudien mit den beladenen PLGA-Nanopartikeln in Puffer zeigten für beide Naturstoffe eine überlegene Freisetzung gegenüber den Wirkstofflösungen. Im Falle von Embelin kann es durch saure Hydrolyse, erhöhte Temperatur oder oxidativen Stress zu einer Etherifizierung des Wirkstoffes an der 5-Hydroxygruppe zum entsprechenden Methylether kommen [156]. Embelin-beladene unmodifizierte Partikel zeigten bei 8 und 12 h eine etwa 5 % höhere und Chitosan-modifizierte PLGA-Nanopartikel mehr als die doppelte Konzentration an Wirkstoff (Kapitel 3.1.5.3). Eine Freisetzung im Zeitfenster zwischen 8 und 12 h kann daher begünstigt werden. Im Fall von Retinol-beladenen PLGA-Nanopartikeln zeigten unmodifizierte und mit Chitosan-modifizierte Partikel eine etwa doppelt so hohe Konzentration von Retinol nach 8 und 12 h, für Albumin-modifizierte Nanopartikel wurde die dreifache Menge an Retinol in diesem Zeitfenster freigesetzt (Kapitel 3.1.6.5), vermutlich

durch die erhöhte Stabilität durch die Bindung von Retinol an Albumin [93]. Dies wird durch die Ergebnisse der Photostabilitätsstudien unterstützt. In den durchgeführten Photostabilitätsstudien wurde nach 24 h – unabhängig von der Modifikation der Nanopartikel – eine etwa dreifach höhere Menge an Retinol (verglichen gegen die Wirkstofflösung) in den beladenen PLGA-Nanopartikeln wiedergefunden. Wang *et al.* beschrieb in ähnlichen Versuchen eine Reduktion von Retinolpalmitat auf 10 % innerhalb von 80 min [264].

Um die erhaltenen *in vitro*-Ergebnisse in Zellversuchen zu bestätigen bzw. weitere Erkenntnisse zu gewinnen, ist eine toxikologische Untersuchung der PLGA-Nanopartikel unumgänglich. Vor dem Hintergrund der biologischen Verträglichkeit wird in der Literatur die Verwendung von organischen Lösungsmitteln zur Herstellung von PLGA-Nanopartikeln kritisch diskutiert [241]. Ethylacetat ist laut dem *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) als organisches Lösungsmittel der Klasse 3 gruppiert. Diese Lösungsmittel gelten als weniger toxisch und sind daher für die Herstellung von Arzneimitteln zu bevorzugen [265]. Mit Hilfe des CellTiter-Glo®-Versuchs wurde das toxikologische Potential der Wirkstoffe, sowie der entsprechend beladenen und unbeladenen Wirkstoffträgersysteme ermittelt (Kapitel 3.2.1). Die unbeladenen und mit Retinol beladenen PLGA-Nanopartikel zeigten unabhängig von der Modifikation (mit Albumin bzw. Chitosan) keine zytotoxischen Anzeichen bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml. Daher können die Wirkstoffträgersysteme in diesem Fall nach ISO 10993-5:2009 bis zu einer Konzentration von 1,0 mg/ml als gut verträglich eingestuft werden. Wen *et al.* zeigte für unmodifizierte und Chitosan-modifizierte PLGA-Nanopartikel bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml eine gute Verträglichkeit (Zellviabilität über 70 %) [266]. Embelin-beladene Nanopartikel zeigten für die höchste Konzentration an Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln (1 mg/ml) in den durchgeführten Versuchen eine Zellviabilität von 54 % und können daher ab einer Konzentration von 1 mg/ml als zytotoxisch eingestuft werden. Vermutlich ist die verminderte Zellviabilität das Ergebnis aus den antiproliferativen Eigenschaften des Embelins in Kombination mit der positiven Ladung des Chitosans bzw. der daraus resultierenden elektrostatischen Wechselwirkung zwischen kationischem Chitosan und der anionischen Zellmembranen [232]. Ein Einfluss des organischen Lösungsmittels hingegen ist unwahrscheinlich, da die Lösungsmittelrückstände bei allen Formulierungen einen zytotoxischen Effekt auslösen würden.

Um dem 3R-Prinzip gerecht zu werden und das toxikologische Profil der verwendeten Nanopartikel und Wirkstoffe hinsichtlich der Bedingungen unter dynamischem Blutfluss zu erweitern, wurde ein schalenloses Hühnereimodell – der Hühnerei-Test an der *Chick-Area-Vasculosa* (HET-CAV) – angewendet [267]. Dieser Test ermöglicht die Untersuchung von Nanopartikelinteraktionen an der Dottersackhaut, welche aus toxikologischer Sicht vergleichbar mit Schleimhäuten am Auge von Säugetieren ist [268]. Fullstone *et al.* zeigte in verschiedenen Modellen, dass sich die Eigenschaften von Nanopartikeln unter dynamischen Bedingungen im Blutkreislauf hinsichtlich der Zellaufnahme, Immunantwort und Wirkstofffreisetzung ändern und deshalb Untersuchungen in dynamischen Systemen fester Bestandteil bei der Erstellung eines toxikologischen und physikochemischen Profils von Nanopartikeln sein sollten [75, 269]. Während im HET-CAM nur Hämorrhagie, Lyse und Koagulation in einem kleinen Bereich ausgewertet werden können, war es möglich durch den schalenlosen HET-CAV eine umfassende Auswertung des Gefäßsystems bzw. der kompletten CAV durchzuführen und den Herzschlag zu beobachten. Der HET-CAV bzw. die Injektionstechnik wurde in dieser Arbeit hinsichtlich der Applikation von lipophilen Substanzen und PLGA-Nanopartikeln weiterentwickelt und es konnte durch die Applikation von Dimethylsulfoxid (DMSO), Hämolyse als zusätzlicher Effekt etabliert werden [270]. Die Bestimmung von Hämolyse über den HET-CAV mit dem Ziel toxikologische Grenzwerte festzulegen, könnte Grundlage weiterer Versuche sein. In der Literatur werden als *in vitro*-Studien für die Einschätzung der Bluttoxizität hinsichtlich einer Hämolyse oder Aggregation von Blutbestandteilen vor allem Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten verwendet [75, 271]. In Zukunft könnten diese separat durchgeführten Versuche zur Bluttoxizität ersetzt werden.

Aufgrund der innovativen Methodenoptimierung war es ferner möglich ein toxikologisches Profil für die eingesetzten Wirkstoffe, die Wirkstoffträgersysteme, sowie für häufig eingesetzte organische Lösungsmittel zu erstellen. Die Auswertung der toxikologischen Lösungsmittel-Profile für eine lokale Applikation ergab eine gute Verträglichkeit von methanolischen und ethanolischen Lösungen bis zu einer Konzentration von 20 %. Laut ICH Guideline Q3C (R6) wird Methanol in Klasse 2 „*Solvents to be limited*“ und Ethanol in Klasse 3 „*Solvents with low toxic potential*“ der organischen Lösungsmittel eingestuft [265]. Dementsprechend wurde für die systemische Applikation der Naturstoffe Embelin und Retinol eine 20 % ethanolische Lösung genutzt. DMSO wird von der ICH zwar ebenfalls als Klasse 3



Lösungsmittel eingestuft und zeigte laut Worthley *et al.* bei *i. v.* -Gabe (Maus) eine LD<sub>50</sub> von lediglich 3,8 g pro kg Körpergewicht, allerdings führte die lokale Applikation von reinem DMSO im HET-CAV zu schweren Schädigungen der CAV und in allen Fällen zum Tod des Hühnereis [272]. Laut MAK-Kommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zeigte DMSO im Draize-Test ebenfalls nur leichte Irritationen der Schleimhäute [273]. Der HET-CAV kann daher, aufgrund seiner sensiblen Reaktion auf schleimhautreizende Stoffe, Anhaltspunkte für die Art und Weise liefern, in der das Gefäßsystem oder Blutbestandteile beeinflusst werden, die durch den Draize-Test verborgen blieben [274]. Aufgrund der ungehinderten Ausbreitung der getesteten Lösungsmittel über die CAV, traten deren schädliche Effekte großflächig auf. Somit kann der HET-CAV in dieser Form praktisch als „Frühwarnsystem“ verstanden werden. Eine lokale Applikation der Lösungsmittel bei der das Lösungsmittel in einem kleinen Areal auf der CAV gehalten wird (z. B. durch eine Barriere), würde vermutlich weniger starke Effekte zeigen. Dementsprechend wirkten die Eier gegenüber einer systemischen Applikation deutlich robuster und zeigten weniger häufig toxikologische Reaktionen, die zum Herzstillstand des Hühnereis führten. In dieser Arbeit führten weder die systemisch applizierten Naturstoffe, noch die untersuchten PLGA-Nanopartikel zu schädlichen Reaktionen am Gefäßsystem oder den Blutbestandteilen des Hühnereis während des Untersuchungszeitraums von 24 h. Vor dem Hintergrund, dass in diesem Entwicklungsstadium des Hühnereis die CAV keine Immunzellen enthält und weder Nieren noch Leber voll ausgebildet sind um das Blut zu filtern und ein enzymatischer Metabolismus von Fremdstoffen im Blutkreislauf praktisch nicht stattfindet, sollte dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden [192].

Für das toxikologische Profil der untersuchten PLGA-Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem kann zusammengefasst davon ausgegangen werden, dass diese gut verträglich hinsichtlich der Interaktion mit Blutbestandteilen sind. Sowohl unbeladene als auch mit Wirkstoff beladene PLGA-Nanopartikel zeigten bis zu einer Konzentration von 1,0 mg/ml, bzw. 0,5 mg/ml im Falle von Embelin-beladenen mit Chitosan-modifizierten Nanopartikel, eine gute Verträglichkeit gegenüber L929-Zellen im CellTiter-Glo®-Assay. Derman *et al.* berichtete von unbeladenen PLGA-Nanopartikeln, welche mittels Emulsionsverfahren mit Dichlormethan (Lösungsmittel der Klasse 2 lt. ICH Guideline Q3C (R6)) hergestellt wurden und bereits in einer Konzentration von 0,5 mg/ml die Zellviabilität von L929-Zellen auf 70 % senkten [275]. Basierend auf den zytotoxikologischen Untersuchungen der unbeladenen PLGA-Nanopartikel, die mittels Ethylacetat als organisches Lösungsmittel hergestellt wurden, ist das Wirkstoffträgersystem

als Ursache für eine verminderte Zellviabilität im Falle der Embelin-beladenen mit Chitosan-modifizierten Nanopartikel eher unwahrscheinlich (Kapitel 3.2.1.1). Allerdings könnte die durch Chitosan verstärkte ladungsvermittelte Interaktion in Verbindung mit den von Sumalatha *et al.* berichteten antiproliferativen Eigenschaften des Embelins ursächlich für ein vermindertes Wachstum der L929-Zellen sein [276]. Daraus resultierend wäre im Vergleich zu unbehandelten Zellen bzw. der Negativkontrolle weniger Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt worden, auch ohne echten zytotoxischen Effekt im Sinne einer schädlichen Zellwirkung.

Während der Freisetzungsversuche an Caco-2-Zellen blieb der TEER-Wert unabhängig von den untersuchten PLGA-Nanopartikeln bei allen Versuchen und über den gesamten Versuchszeitraum von jeweils 8 h stabil. Dementsprechend ist ein zytotoxisches Verhalten gegenüber Caco-2-Zellen und eine Schädigung der *tight junctions* während der Versuche unwahrscheinlich. Anhand der durchgeführten Freisetzungsstudien an Caco-2-Zellmonolayern kann eine Einschätzung getroffen werden, inwieweit die beladenen Wirkstoffe kontrolliert lokal auf der luminalen Seite – die den therapiebedürftigen Teil im Falle von CED darstellt – freigesetzt werden, durch die Caco-2-Zellen adsorbiert, absorbiert oder über die basolaterale Seite abtransportiert werden [277]. Retinol erhöht die Bildung der *tight junction*-Proteine Zo-1, Occludin und Claudin-1 im Darmepithel. Dies führt zu einer Stabilisierung der *tight junctions*, welche im Falle von CED oft beschädigt sind und eine Grundlage für die Chronifizierung der Entzündung bieten [278]. Retinsäure – ein aktiver Metabolit von Retinol – reduziert die Differenzierung von T-Zellen in Th17-Zellen, welche eine Reihe proinflammatorische Zytokine bilden, die Einwanderung von Neutrophilen begünstigen und eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von mukosale Entzündungen spielen [279]. Retinol wird von Caco-2-Zellen aufgenommen und in Fettsäuren wie Retinyloleat und Retinylpalmitat metabolisiert, worauf diese auf der basolaterale Seite sekretiert werden [280]. Retinol liegt extra- wie intrazellulär meist gebunden an Retinolbindungsproteinen (RBP) vor und kann durch passive Diffusion sowie durch Rezeptoren für RBP (z. B. Stra6) oder Transporter für Lipoproteinen (z. B. SCARB1) von Zellen des Darmepithels aufgenommen werden [281, 282]. Da der Übertritt von Wirkstoffen in den systemischen Kreislauf mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sein kann und der Ort des Entzündungsgeschehens bei CED lokal begrenzt ist, ist das Ziel einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung in diesem Fall eine möglichst geringe basolaterale Konzentration [283].

Von der Retinollösung waren nach 2 h weniger als 1 % Wirkstoff auf der luminalen Seite zu finden. Im Falle der beladenen Nanopartikel betrug die Wirkstoffkonzentration im luminalen Medium nach 2 h zwischen 19 – 46 % (Kapitel 3.3.2). Die höchste Wirkstoffkonzentration nach 8 h auf der luminalen Seite zeigten Albumin-modifizierte Nanopartikel mit  $10 \pm 3$  % Wirkstoff. Der basolaterale Abtransport des Wirkstoffes fiel in allen Fällen gering aus (maximale Konzentration unter 2 %). Aus der Embelinlösung waren nach 2 h noch etwa 6 % des Embelins auf der luminalen Seite zu finden. Eine Beladung von Embelin in PLGA-Nanopartikel führte im Gegensatz zu der freien Wirkstofflösung nach 2 h zu einer deutlich höheren Konzentration von  $17 \pm 4$  % auf der luminalen Seite (Kapitel 3.3.1). Im Vergleich zu den Freisetzungsversuchen in PBS sank die vorhandene Konzentration beider Wirkstoffe schneller ab. Da die Konzentration auf der basolateralen Seite in beiden Fällen weder durch die Wirkstofflösung, noch durch die beladenen Nanopartikel wesentlich erhöht wurde, liegt höchstwahrscheinlich ein metabolischer Abbau bzw. Abtransport aus dem Medium durch die Caco-2-Zellen vor. Durch die fettsäureähnliche Struktur von Embelin wird ein Teil des Wirkstoffes vermutlich durch die Caco-2-Zellen über Fettsäuretransporter aufgenommen und anschließend metabolisiert [284]. Eine Auswertung der prozentualen Verteilung des Embelins am Ende der achtstündigen Freisetzungsversuche ergab, dass die Konzentration im Medium im Falle der Wirkstofflösung bei 35 % lag. Durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel befand sich nach 8 h ein deutlich geringerer Anteil von 7 % im Medium. Eine Beladung von Retinol in PLGA-Nanopartikel führte verglichen zu der Wirkstofflösung unabhängig von der Partikel-Modifikation ebenfalls zu einer deutlich höheren Konzentration auf der luminalen Seite, mit bis zu 23 % im Falle der Albumin-Modifikation (Kapitel 3.3.2). Die Auswertung der Wirkstoffverteilung am Ende der Versuche zeigte, dass sich im Gegensatz zu der Wirkstofflösung (Anteil im Medium: 63 %) bis zu 24 % weniger Wirkstoff im Medium befanden (Anteil im Medium durch Nanopartikel: 39 – 48 %). Die erhöhte Aufnahme im Falle von Chitosan-modifizierten PLGA-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen wurde unter anderem bereits von Kawashima *et al.* gezeigt [113]. Meist wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen positiver Oberflächenladung der Partikel (durch Chitosan) und negativ geladener Zellmembran für eine erhöhte Zellaufnahme vermutet. In den hier durchgeführten Freisetzungsstudien wurde allerdings auch für die negativ geladenen Albumin-modifizierten PLGA-Nanopartikel ein vergleichbarer Wirkstoffanteil nach dem Lysieren der Caco-2-Zellen gefunden. Die Änderung der Wirkstoffverteilung durch PLGA-Nanopartikel in Richtung adsorptiv bzw. intrazellulär könnte

die Effektivität beider Wirkstoffe fördern, da diese so direkt mit den betroffenen Zellen interagieren können [233, 285]. Im Endeffekt zeigte die Beladung in PLGA-Nanopartikel für beide Wirkstoffe die gewünschte lokale Freisetzung an der luminalen Seite, ohne nennenswerten Abtransport über die basolaterale Seite.

Aus der Literatur ist bekannt, dass in manchen Fällen die Beladung eines Wirkstoffes in polymerbasierte Nanopartikel zu einer verminderten therapeutischen Wirkung führen kann, z. B. durch eine verminderte Freisetzung an der entsprechenden Zielstruktur [286]. Die Aktivität der beladenen Wirkstoffe wurde in einem zellbasierten Versuch mit humanen neutrophilen Granulozyten untersucht und über die Hemmung der 5-LOX-Produktbildung als Indikator für die antiinflammatorische Aktivität ermittelt. Embelin zeigte sowohl als Wirkstofflösung, als auch beladen in PLGA-Nanopartikel eine vergleichbare Hemmwirkung der 5-LOX-Produktbildung (Kapitel 3.4.1). Im Falle von Retinol konnte die Hemmwirkung durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel deutlich gesteigert werden (Kapitel 3.4.2). Die  $IC_{50}$  verringerte sich von 20  $\mu M$  auf etwa 2 – 4  $\mu M$ . Vor dem Hintergrund, dass vermutlich auch Abbauprodukte von Retinol eine Hemmung der 5-LOX verursachen könnten, sind weitere Versuche nötig, um die exakte Hemmwirkung von Retinol auf die 5-LOX zu ermitteln [287]. Schlussendlich gab es keine Anzeichen dafür, dass die Aktivität der beiden Naturstoffe negativ durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel beeinträchtigt wurde.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein innovatives Wirkstoffträgersystem für zwei lipophile Naturstoffe (Embelin und Retinol) auf Basis von PLGA-Nanopartikeln entwickelt. Durch die Modifikation der Nanopartikel mit Albumin oder Chitosan wurden die Beladungseffizienz, Stabilität und Freisetzung der Wirkstoffe verändert und optimiert. Mit Hilfe der Beladung von antiinflammatorisch wirkenden Naturstoffen in das vorgestellte Wirkstoffträgersystem könnte eine weitere Therapieoption für chronisch entzündliche Darmerkrankungen geschaffen werden. Vor allem hinsichtlich physikochemischer Stabilität, Lagerbarkeit und kontrollierter Freisetzung der Wirkstoffe konnte gezeigt werden, dass eine Beladung von Embelin und Retinol in PLGA-Nanopartikel von Vorteil sein kann.

Die Methodenparameter der Partikelherstellung wurden hinsichtlich Umdrehungszahl des Homogenisators, Konzentration des Emulgators, Temperatur und Zentrifugationsgeschwindigkeit bei der Aufreinigung optimiert, und in Bezug auf Morphologie, physikochemische Eigenschaften und das toxikologische Profil der Nanopartikel charakterisiert. Durch die optimierte Herstellungsmethode war es möglich PLGA-Nanopartikel mit einem Durchmesser im Größenbereich von 200 nm und enger Partikelgrößenverteilung herzustellen. Ferner wurden beladene PLGA-Nanopartikel mit Albumin- oder Chitosan-Modifikation für beide Naturstoffe entwickelt, die die Qualitätsansprüche hinsichtlich Partikelgröße und -verteilung erfüllten. Für Retinol wurde eine Herstellungsmethode entwickelt, die den Ausschluss von Licht und Luftsauerstoff gewährleistet. Dies ermöglichte eine erhöhte Beladungseffizienz des Retinols. Durch die erfolgreiche Modifikation der Nanopartikel mit Albumin oder Chitosan konnte Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften, die Morphologie, die Beladungseffizienz und das toxikologische Profil der Partikel genommen werden. Neben der Entwicklung einer innovativen Herstellungsmethode wurden zwei neue – gegenüber biologischen Medien und Matrixbestandteilen – robuste HPLC-Methoden entwickelt, mittels derer eine zuverlässige Quantifizierung der Wirkstoffe in den Freisetzungsversuchen, Stabilitätsstudien und während der allgemeinen Charakterisierung (z. B. Bestimmung der Beladungseffizienz) möglich war. Neben den zytotoxischen Untersuchungen an L929-Zellen mittels CellTiter-Glo®-Assay inklusive mikroskopischer Bewertung der Zellen, wurde der schalenlose HET-CAV – welcher eine Untersuchung unter dynamischem Blutfluss ermöglicht – angewendet und für die Anwendung lipophiler Substanzen, organischer Lösungsmittel und PLGA-Nanopartikel

weiterentwickelt, und die Hämolyse als zu beobachtender Effekt neu etabliert. Basierend darauf wurde gezeigt, dass eine qualitative und differenzierte Aussage über Hämorrhagie, vaskuläre Lyse, Aggregation von Blutbestandteilen, Hämolyse und Stillstand des Herzschlages durch den HET-CAV möglich ist. Zukünftig könnte der HET-CAV auf dieser Grundlage als wertvolles Frühwarnsystem das toxikologische Spektrum erweitern und zusätzliche Versuche zur Hämotoxizität ersetzen.

Die durchgeführten *in vitro*-Freisetzungsstudien in PBS zeigten für alle Modifikationen und für beide Naturstoffe eine überlegene Freisetzung bei 8 h und 12 h. Im Falle von Embelin erwiesen sich die mit Chitosan modifizierten Nanopartikel als besonders vorteilhaft. Als Folge daraus konnte durch die Beladung in das entwickelte Wirkstoffträgersystem die Konzentration von Embelin im Freisetzungsmedium gegenüber der Wirkstofflösung mehr als verdoppelt werden. Die Konzentration von Retinol im Freisetzungsmedium konnte im genannten Zeitraum durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel verdoppelt und im Falle der Albumin-modifizierten Nanopartikel nahezu verdreifacht werden. Die Freisetzung an Caco-2-Zellen bestätigte die gute Verträglichkeit der beladenen Wirkstoffträger auf zellulärer Ebene. Weder die TEER-Werte, noch die Morphologie der Zellen wurden während dem Freisetzungszeitraum nachteilig beeinflusst. Ferner konnte in diesen Freisetzungsstudien gezeigt werden, dass das entwickelte Wirkstoffträgersystem beide Wirkstoffe im untersuchten Zeitraum jeweils kontrolliert auf der luminalen Seite freisetzen und die Wirkstoffverteilung beeinflussen kann. Durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel konnte nach 2 h etwa die dreifache Konzentration an Embelin auf der luminalen Seite gefunden werden, verglichen zu der Wirkstofflösung. Im Falle von Retinol konnte auf der luminalen Seite bereits nach 2 h nur noch 1 % der applizierten Wirkstofflösung gefunden werden. Durch die Beladung in Albumin-modifizierte Nanopartikel betrug die Konzentration auf der luminalen Seite nach 4 h etwa 23 %. Während sich durch die entsprechende Wirkstofflösung beide Naturstoffe vor allem im Medium der luminalen Seite verteilten, konnte durch die Beladung in PLGA-Nanopartikel der adsorptive und intrazelluläre Anteil beider Wirkstoffe erhöht werden, ohne die Konzentration auf der basolateralen Seite – welche einen unerwünschten systemischen Abtransport der Wirkstoffe begünstigen würde – zu erhöhen.

Zusammengefasst kann das in dieser Arbeit entwickelte innovative Wirkstoffträgersystem die Naturstoffe Embelin und Retinol vor physikochemischen Abbau schützen und diese

kontrolliert freisetzen. Ferner besteht das Potential als Basis für weitere lipophile und innovative Wirkstoffe zu dienen, und die Therapieoptionen für CED zu erweitern.

## Summary

In the present work, an innovative drug carrier system for two lipophilic natural substances (embelin and retinol) based on PLGA-nanoparticles was developed. Loading efficiency, stability and release of the active ingredients were modified and optimized by modifying the nanoparticles with albumin or chitosan. By loading natural substances with an anti-inflammatory effect into these drug carrier systems presented, a further treatment option for chronic inflammatory bowel diseases could be developed. Especially with regard to physicochemical stability, storability and controlled release of the active ingredients, it could be shown that loading embelin and retinol in PLGA-nanoparticles can be advantageous.

The parameters of the particle formation were optimized with regard to the rotation speed of the homogenizer, concentration of the emulsifier, reaction temperature and centrifugation speed during the purification, and the nanoparticles were characterized in terms of morphology, physicochemical properties and their toxicological profile. The optimized manufacturing method allowed the formulation of PLGA-nanoparticles with a diameter in the size range of 200 nm and a narrow particle size distribution. Furthermore, loaded PLGA-nanoparticles with albumin or chitosan modification were developed for both natural products, which met the quality requirements with regard to particle size and distribution. A manufacturing method has been developed for retinol that enables the nanoparticle formation under the exclusion of light and atmospheric oxygen. This improved the loading efficiency of retinol. The successful modification of the nanoparticles with albumin or chitosan made it possible to control the physicochemical properties, the morphology, the loading efficiency and the toxicological profile of the particles. In addition to the development of a new formulation technique, two new HPLC methods – which are robust with respect to biological media and matrix components – were developed, by means of that a reliable quantification of the active substances in the release experiments, stability studies and during the general characterization (e. g. determination of the loading efficiency) was possible.

In addition to the cytotoxic assessments on L929 cells using the CellTiter-Glo® assay including microscopic evaluation of the cells, the shell-less HET-CAV – which enables an examination under dynamic blood flow – was used and further developed for the application of lipophilic

substances, organic solvents and PLGA-nanoparticles, with hemolysis established as a new read-out. Based on this, it was shown that a qualitative and discriminative assessment regarding hemorrhage, vascular lysis, aggregation of blood components, hemolysis and stopping of the heartbeat is possible by the HET CAV. In the future, the toxicological spectrum could be expanded by the HET-CAV as a valuable early warning system and as a result replace additional tests for hemotoxicity.

The *in vitro* release studies carried out in PBS showed a superior release at 8 h and 12 h for all nanoparticle modifications and for both natural drugs. In the case of Embelin, the nanoparticles modified with chitosan proved to be particularly advantageous. As a result, the concentration of embelin in the release medium compared to the active ingredient solution could be more than doubled by loading into the developed drug carrier system. During the named period, the concentration of retinol in the release medium could be doubled by loading it into PLGA-nanoparticles and almost tripled in the case of the albumin modified nanoparticles. The release on Caco-2 cells confirmed the good tolerance of the loaded drug carriers at cell level. Neither the TEER values nor the morphology of the cells were adversely affected during the release period. Furthermore, it could be shown in these release studies that the developed drug carrier system releases both drugs in a controlled manner on the luminal side during the examined period and can influence the drug distribution. As a result of the loading in PLGA nanoparticles, about three times the concentration of embelin could be found on the luminal side after 2 h compared to the drug solution. In the case of retinol, only 1% of the applied drug solution could be found on the luminal side after 2 h. Due to the loading in albumin modified nanoparticles, the concentration on the luminal side was about 23% after 4 h. While both natural substances were mainly distributed in the medium on the luminal side due to the corresponding drug solution, the loading in PLGA-nanoparticles increased the adsorptive and intracellular content of both drugs without increasing the concentration on the basolateral side, which would promote undesired systemic removal of the active ingredients.

In summary, the innovative drug carrier system developed in this work can protect the natural substances embelin and retinol from physicochemical degradation and release them in a controlled manner. There is also the potential to serve as the basis for other lipophilic and innovative active ingredients and to expand the treatment options for IBD.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Tiwari, G., et al., *Drug delivery systems: An updated review*. Int J Pharm Investig, 2012. **2**(1): p. 2-11.
2. Wang, W., et al., *Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration*. Journal of nanobiotechnology, 2019. **17**(82): p. 1-15.
3. Paul, S.M., et al., *How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 203-214.
4. Lindner, J.R., Link, J., *Molecular Imaging in Drug Discovery and Development*. Circulation. Cardiovascular imaging, 2018. **11**(2): p. 1-21.
5. Swider, E., et al., *Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications*. Acta Biomaterialia, 2018. **73**: p. 38-51.
6. Kommission, E. *Pressemitteilung: Was ist ein „Nanomaterial“? Europäische Kommission legt erstmals gemeinsame Definition vor*. 2011; Available from: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_de.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_de.htm).
7. Wagner, S., et al., *Finde den Unterschied: synthetische und natürliche Nanopartikel in der Umwelt – Freisetzung, Verhalten und Verbleib*. Angewandte Chemie, 2014. **126**(46): p. 12604-12626.
8. Kreuter, J., *Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know?* Adv Drug Deliv Rev, 2014. **71**: p. 2-14.
9. Ulbrich, K., et al., *Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies*. Chemical Reviews, 2016. **116**(9): p. 5338-5431.
10. Kulkarni, S.A. and S.-S. Feng, *Effects of surface modification on delivery efficiency of biodegradable nanoparticles across the blood–brain barrier*. Nanomedicine, 2011. **6**(2): p. 377-394.
11. Suk, J.S., et al., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **99**(Pt A): p. 28-51.
12. Butcher, N.J., G.M. Mortimer, and R.F. Minchin, *Unravelling the stealth effect*. Nature Nanotechnology, 2016. **11**: p. 310-311.
13. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. The American journal of pathology, 2000. **156**(4): p. 1363-1380.
14. Gabriel, E.M., et al., *Intravital microscopy in the study of the tumor microenvironment: from bench to human application*. Oncotarget, 2018. **9**(28): p. 20165-20178.
15. Leu, A.J., et al., *Absence of Functional Lymphatics within a Murine Sarcoma: A Molecular and Functional Evaluation*. Cancer Research, 2000. **60**(16): p. 4324-4327.
16. Stachura, J., et al., *The dual role of tumor lymphatic vessels in dissemination of metastases and immune response development*. Oncoimmunology, 2016. **5**(7): p. 1-10.
17. Barenholz, Y., *Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned*. Journal of Controlled Release, 2012. **160**(2): p. 117-134.
18. Miele, E., et al., *Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer*. International journal of nanomedicine, 2009. **4**: p. 99-105.
19. Calzoni, E., et al., *Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies*. J Funct Biomater, 2019. **10**(4): p. 1-15.
20. Lamprecht, A., U. Schafer, and C.M. Lehr, *Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa*. Pharm Res, 2001. **18**(6): p. 788-93.
21. Nehoff, H., et al., *Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 2539-2555.
22. Danhier, F., et al., *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. J Control Release, 2012. **161**(2): p. 505-522.
23. Wu, J.-Z., et al., *Insulin-loaded PLGA microspheres for glucose-responsive release*. Drug Delivery, 2017. **24**(1): p. 1513-1525.

24. Guterres, S.S., M.P. Alves, and A.R. Pohlmann, *Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications*. Drug target insights, 2007. **2**: p. 147-157.
25. Huang, W. and C. Zhang, *Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation*. Biotechnology journal, 2018. **13**(1): p. 1-19.
26. Liebler, D.C. and F.P. Guengerich, *Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity*. Nature Reviews Drug Discovery, 2005. **4**: p. 410-420.
27. Onoue, S., S. Yamada, and H.K. Chan, *Nanodrugs: pharmacokinetics and safety*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1025-1037.
28. Rostami-Hodjegan, A. and G.T. Tucker, *Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data*. Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**: p. 140-148.
29. Prokop, A. and J.M. Davidson, *Nanovehicular Intracellular Delivery Systems*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(9): p. 3518-3590.
30. Li, R., et al., *Cell membrane-based nanoparticles: a new biomimetic platform for tumor diagnosis and treatment*. Acta pharmaceutica Sinica. B, 2018. **8**(1): p. 14-22.
31. Alvarez-Fuentes, J., et al., *Development of enteric-coated timed-release matrix tablets for colon targeting*. J Drug Target, 2004. **12**(9-10): p. 607-612.
32. Gao, C., et al., *Novel drug delivery systems of Chinese medicine for the treatment of inflammatory bowel disease*. Chinese medicine, 2019. **14**(23): p. 1-17.
33. Inpanathan, S. and R.J. Botelho, *The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times*. Frontiers in cell and developmental biology, 2019. **7**(113): p. 1-22.
34. Banerjee, I., D. Mishra, and T.K. Maiti, *PLGA Microspheres Incorporated Gelatin Scaffold: Microspheres Modulate Scaffold Properties*. International journal of biomaterials, 2009. **2009**(143659): p. 1-9.
35. Son, G.-H., B.-J. Lee, and C.-W. Cho, *Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Investigation, 2017. **47**(4): p. 287-296.
36. Wischke, C. and S.P. Schwendeman, *Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles*. Int J Pharm, 2008. **364**(2): p. 298-327.
37. Wang, J., B.M. Wang, and S.P. Schwendeman, *Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres*. Journal of Controlled Release, 2002. **82**(2): p. 289-307.
38. Hawa, T. and M.R. Zachariah, *Internal pressure and surface tension of bare and hydrogen coated silicon nanoparticles*. J Chem Phys, 2004. **121**(18): p. 9043-9049.
39. Rizvi, S.A.A. and A.M. Saleh, *Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2018. **26**(1): p. 64-70.
40. Gasmi, H., et al., *Towards a better understanding of the different release phases from PLGA microparticles: Dexamethasone-loaded systems*. Int J Pharm, 2016. **514**(1): p. 189-199.
41. Enayati, M., et al., *Modification of the release characteristics of estradiol encapsulated in PLGA particles via surface coating*. Therapeutic delivery, 2012. **3**(2): p. 209-226.
42. Vay, K., S. Scheler, and W. Friess, *Application of Hansen solubility parameters for understanding and prediction of drug distribution in microspheres*. Int J Pharm, 2011. **416**(1): p. 202-209.
43. Kreuter, J., *Nanoparticles and nanocapsules--new dosage forms in the nanometer size range*. Pharm Acta Helv, 1978. **53**(2): p. 33-39.
44. Wang, Y., et al., *Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer*. Nanomaterials (Basel, Switzerland), 2016. **6**(26): p. 1-18.
45. Junghanns, J.U. and R.H. Muller, *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications*. Int J Nanomedicine, 2008. **3**(3): p. 295-309.
46. Ezhilarasi, P.N., et al., *Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review*. Food and Bioprocess Technology, 2013. **6**(3): p. 628-647.
47. Jain, R.A., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2475-2490.

48. Prakapenka, A.V., H.A. Bimonte-Nelson, and R.W. Sirianni, *Engineering poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) micro- and nano-carriers for Controlled Delivery of 17 $\beta$ -Estradiol*. Annals of biomedical engineering, 2017. **45**(7): p. 1697-1709.
49. Barichello, J.M., et al., *Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1999. **25**(4): p. 471-476.
50. Venier-Julienne, M.C., et al., *In Vitro Study of the Anti-Leishmanial Activity of Biodegradable Nanoparticles*. Journal of Drug Targeting, 1995. **3**(1): p. 23-29.
51. Lemoine, D., et al., *Stability study of nanoparticles of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)*. Biomaterials, 1996. **17**(22): p. 2191-2197.
52. Joye, I.J. and D.J. McClements, *Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014. **19**(5): p. 417-427.
53. Ahire, E., et al., *Parenteral nanosuspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications*. Acta pharmaceutica Sinica. B, 2018. **8**(5): p. 733-755.
54. Turk, C.T., et al., *Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments*. AAPS PharmSciTech, 2014. **15**(1): p. 161-176.
55. Sengel-Turk, C.T., et al., *Preparation and in vitro evaluation of meloxicam-loaded PLGA nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells*. Drug Dev Ind Pharm, 2012. **38**(9): p. 1107-1116.
56. Menon, J.U., et al., *Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100A**(8): p. 1998-2005.
57. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(7): p. 887-913.
58. Javadzadeh, Y., et al., *Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010. **81**(2): p. 498-502.
59. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. Polymers (Basel), 2011. **3**(3): p. 1377-1397.
60. Mundargi, R.C., et al., *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. Journal of Controlled Release, 2008. **125**(3): p. 193-209.
61. Sahana, D.K., et al., *PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: Influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior In Vitro and In Vivo using estradiol as a model drug*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(4): p. 1530-1542.
62. Krug, H.F., *Nanotechnologie versus Nanotoxikologie - Wohin geht die Reise? Nanotechnologie - von der Forschung in die Schule*, 2015. **4**(64): p. 11-17.
63. Zhu, M., et al., *Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate*. Acc Chem Res, 2013. **46**(3): p. 622-631.
64. Rasmussen, K., et al., *Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018. **92**: p. 8-28.
65. Keck, C., *Partikelgrößenanalytik für Nanopartikel*. TechnoPharm Analytik, 2012. **2**(Nr. 4): p. 279-287.
66. Pancani, E., et al., *Nanoparticles with high payloads of pipemidic acid, a poorly soluble crystalline drug: drug-initiated polymerization and self-assembly approach*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2018. **8**(3): p. 420-431.
67. Bozentka, D.J., *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. Journal of Hand Surgery, 1993. **18**(6): p. 1130.
68. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.

69. Pöttinger, Y., et al., *Polyelectrolyte layer assembly of bacterial nanocellulose whiskers with plasmid DNA as biocompatible non-viral gene delivery system*. Cellulose, 2018. **25**(3): p. 1939-1960.
70. Williams, D.F., *There is no such thing as a biocompatible material*. Biomaterials, 2014. **35**(38): p. 10009-10014.
71. Williams, D.F., *The Biomaterials Conundrum in Tissue Engineering*. Tissue Engineering Part A, 2014. **20**(7-8): p. 1129-1131.
72. Constantin, C.P., et al., *Biocompatibility of Polyimides: A Mini-Review*. Materials (Basel), 2019. **12**(19): p. 1-27.
73. Mu, Q., et al., *Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems*. Chemical Reviews, 2014. **114**(15): p. 7740-7781.
74. Walczyk, D., et al., *What the Cell "Sees" in Bionanoscience*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(16): p. 5761-5768.
75. Schlenk, F., et al., *Comprehensive analysis of the in vitro and ex ovo hemocompatibility of surface engineered iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Arch Toxicol, 2017. **91**(10): p. 3271-3286.
76. Tenzer, S., et al., *Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology*. Nat Nanotechnol, 2013. **8**(10): p. 772-781.
77. Maiorano, G., et al., *Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response*. ACS Nano, 2010. **4**(12): p. 7481-7491.
78. Nguyen, V.H. and B.J. Lee, *Protein corona: a new approach for nanomedicine design*. Int J Nanomedicine, 2017. **12**: p. 3137-3151.
79. Sempf, K., et al., *Adsorption of plasma proteins on uncoated PLGA nanoparticles*. Eur J Pharm Biopharm, 2013. **85**(1): p. 53-60.
80. Aggarwal, P., et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Advanced drug delivery reviews, 2009. **61**(6): p. 428-437.
81. Karmali, P.P. and D. Simberg, *Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2011. **8**(3): p. 343-357.
82. Vene, E., et al., *Opsonisation of nanoparticles prepared from poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **513**(1): p. 438-452.
83. Mevorach, D., *Opsonization of apoptotic cells. Implications for uptake and autoimmunity*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **926**: p. 226-235.
84. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 283-318.
85. Kou, L., et al., *The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **8**(1): p. 1-10.
86. Gordon, S. and A. Plüddemann, *The Mononuclear Phagocytic System. Generation of Diversity*. Frontiers in immunology, 2019. **10**(1893): p. 1-10.
87. Moman, R.N. and M. Varacallo, *Physiology, Albumin*, in StatPearls. 2018, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
88. Walkey, C.D. and W.C.W. Chan, *Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(7): p. 2780-2799.
89. Gossmann, R., et al., *Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS*. Eur J Pharm Biopharm, 2015. **93**: p. 80-87.
90. de Puig, H., et al., *Effect of the Protein Corona on Antibody–Antigen Binding in Nanoparticle Sandwich Immunoassays*. Bioconjugate Chemistry, 2017. **28**(1): p. 230-238.

91. Gou, Y., et al., *Bio-Inspired Protein-Based Nanoformulations for Cancer Theranostics*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**(421): p. 1-19.
92. Wacker, M., *Nanocarriers for intravenous injection--the long hard road to the market*. Int J Pharm, 2013. **457**(1): p. 50-62.
93. Wu, Y., et al., *Formation of a Multiligand Complex of Bovine Serum Albumin with Retinol, Resveratrol, and (-)-Epigallocatechin-3-gallate for the Protection of Bioactive Components*. Journal of Agric Food Chem, 2017. **65**: p. 3019-3030.
94. Elzoghby, A.O., W.M. Samy, and N.A. Elgindy, *Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2012. **157**(2): p. 168-182.
95. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. J Control Release, 2008. **132**(3): p. 171-183.
96. Manoochchri, S., et al., *Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **21**(58): p. 1-10.
97. An, F.-F. and X.-H. Zhang, *Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery*. Theranostics, 2017. **7**(15): p. 3667-3689.
98. Don, B.R. and G. Kaysen, *POOR NUTRITIONAL STATUS AND INFLAMMATION: Serum Albumin: Relationship to Inflammation and Nutrition*. Seminars in Dialysis, 2004. **17**(6): p. 432-437.
99. Wilhelm, C., et al., *Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating*. Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 1001-1011.
100. Nitta, S.K. and K. Numata, *Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(1): p. 1629-1654.
101. Hirano, S., *Chitin biotechnology applications*. Biotechnol Annu Rev, 1996. **2**: p. 237-258.
102. Kiang, T., et al., *The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection*. Biomaterials, 2004. **25**(22): p. 5293-5301.
103. Singla, A.K. and M. Chawla, *Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update*. J Pharm Pharmacol, 2001. **53**(8): p. 1047-1067.
104. Bowman, K. and K.W. Leong, *Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**(2): p. 117-128.
105. Deacon, M.P., et al., *Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems*. Biochem J, 2000. **348**: p. 557-563.
106. Jana, S. and S. Maiti, *Chapter 20 - Chitosan-based nanoparticulate systems for oral drug delivery*, in *Nanostructures for Oral Medicine*, E. Andronescu and A.M. Grumezescu, Editors. 2017, Elsevier. p. 607-638.
107. Dodane, V., M. Amin Khan, and J.R. Merwin, *Effect of chitosan on epithelial permeability and structure*. Int J Pharm, 1999. **182**(1): p. 21-32.
108. El-Shabouri, M.H., *Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **249**(1): p. 101-108.
109. Je, H.J., et al., *Release Properties and Cellular Uptake in Caco-2 Cells of Size-Controlled Chitosan Nanoparticles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(50): p. 10899-10906.
110. Schipper, N.G., K.M. Varum, and P. Artursson, *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Pharm Res, 1996. **13**(11): p. 1686-1692.
111. Luessen, H.L., et al., *Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo*. Pharm Res, 1996. **13**(11): p. 1668-1672.
112. Kawashima, Y., et al., *Mucoadhesive DL-Lactide/Glycolide Copolymer Nanospheres Coated with Chitosan to Improve Oral Delivery of Elcatonin*. Pharmaceutical Development and Technology, 2000. **5**(1): p. 77-85.

113. Tahara, K., et al., *Oral nuclear factor- $\kappa$ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease*. Biomaterials, 2011. **32**(3): p. 870-878.
114. Lautenschlager, C., et al., *Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **71**: p. 58-76.
115. Ferrero-Miliani, L., et al., *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation*. Clinical and experimental immunology, 2007. **147**(2): p. 227-235.
116. Ng, S.C., et al., *Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies*. The Lancet, 2017. **390**(10114): p. 2769-2778.
117. Vetter, M. and M.F. Neurath, *Emerging oral targeted therapies in inflammatory bowel diseases: opportunities and challenges*. Therap Adv Gastroenterol, 2017. **10**(10): p. 773-790.
118. Nielsen, O.H. and M.A. Ainsworth, *Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2013. **369**(8): p. 754-762.
119. LeBlanc, J.-F., et al., *Elderly patients with inflammatory bowel disease: Updated review of the therapeutic landscape*. World journal of gastroenterology, 2019. **25**(30): p. 4158-4171.
120. Kaplan, G.G., *The global burden of IBD: from 2015 to 2025*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2015. **12**: p. 720-727.
121. Gehrmann, U., et al., *Motivation of patients with inflammatory bowel disease to participate in a clinical trial*. Z Gastroenterol, 2016. **54**(10): p. 1123-1129.
122. Chan, W., et al., *Medication adherence in inflammatory bowel disease*. Intestinal research, 2017. **15**(4): p. 434-445.
123. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Frontiers in immunology, 2014. **5**(508): p. 1-7.
124. Sumagin, R. and C.A. Parkos, *Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration*. Tissue Barriers, 2015. **3**(1-2): p. 1-12.
125. Hall, C.H.T., E.L. Campbell, and S.P. Colgan, *Neutrophils as Components of Mucosal Homeostasis*. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology, 2017. **4**(3): p. 329-337.
126. Kuhl, A.A., et al., *Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1882-1892.
127. Rådmark, O., et al., *5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. **1851**(4): p. 331-339.
128. Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. Oncogene, 1999. **18**: p. 7908-7916.
129. Steinhilber, D. and B. Hofmann, *Recent Advances in the Search for Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2014. **114**(1): p. 70-77.
130. Psarra, A., et al., *Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 inhibitors: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2017. **27**(9): p. 1047-1059.
131. Fogel, D.B., *Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review*. Contemporary clinical trials communications, 2018. **11**: p. 156-164.
132. Shimizu, T. and L.S. Wolfe, *Arachidonic acid cascade and signal transduction*. J Neurochem, 1990. **55**(1): p. 1-15.
133. Gijon, M.A. and C.C. Leslie, *Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 330-336.
134. Werz, O., et al., *Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1044-1052.

135. Anosov, A.K. and A.G. Miramedova, *Calcium-Induced Stimulation of Cyclooxygenase in Rabbit Leukocytes and its Modulation by Ultraviolet Radiation*. Russ J Immunol, 1997. **2**(3-4): p. 211-216.
136. Radmark, O., et al., *5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(7): p. 332-341.
137. Smith, W.L., R.M. Garavito, and D.L. DeWitt, *Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33157-60.
138. Kam, P.C.A. and A.U.L. See, *Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role*. Anaesthesia, 2000. **55**(5): p. 442-449.
139. Coceani, F., et al., *Cyclooxygenase isoenzymes and patency of ductus arteriosus*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2005. **72**(2): p. 71-77.
140. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 145-182.
141. Murakami, M. and I. Kudo, *Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway*. Prog Lipid Res, 2004. **43**(1): p. 3-35.
142. Dey, I., M. Lejeune, and K. Chadee, *Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(6): p. 611-623.
143. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 377-386.
144. Umamaheswaran, S., et al., *Stress, inflammation, and eicosanoids: an emerging perspective*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(2-3): p. 203-211.
145. Hu, C. and S. Ma, *Recent development of lipoxygenase inhibitors as anti-inflammatory agents*. Medchemcomm, 2018. **9**(2): p. 212-225.
146. Di Gennaro, A. and J.Z. Haeggström, *Targeting leukotriene B4 in inflammation*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2014. **18**(1): p. 79-93.
147. Pannunzio, A. and M. Coluccia, *Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 Inhibitors in Cancer: A Review of Oncology and Medicinal Chemistry Literature*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2018. **11**(101): p. 1-20.
148. Haeggström, J.Z., *Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets*. The Journal of Clinical Investigation, 2018. **128**(7): p. 2680-2690.
149. Crusz, S.M. and F.R. Balkwill, *Inflammation and cancer: advances and new agents*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2015. **12**(10): p. 584-596.
150. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
151. Maseda, D., et al., *mPGES-1-Mediated Production of PGE(2) and EP4 Receptor Sensing Regulate T Cell Colonic Inflammation*. Frontiers in immunology, 2018. **9**(2954): p. 1-14.
152. Hieke, M., et al., *A novel class of dual mPGES-1/5-LO inhibitors based on the  $\alpha$ -naphthyl pirinixic acid scaffold*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011. **21**(5): p. 1329-1333.
153. Zappavigna, S., et al., *The 1,4 benzoquinone-featured 5-lipoxygenase inhibitor RF-Id induces apoptotic death through downregulation of IAPs in human glioblastoma cells*. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2016. **35**(167): p. 1-14.
154. Rani, V.U., et al., *Chemical speciation of binary complexes of embelin with some biologically important metal ions*. Acta Chim Slov, 2010. **57**(4): p. 916-921.
155. Yeggoni, D.P., A. Rachamallu, and R. Subramanyam, *Protein stability, conformational change and binding mechanism of human serum albumin upon binding of embelin and its role in disease control*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016. **160**: p. 248-259.
156. Ferreira, G. and K.S. Laddha, *Stress degradation studies on embelin*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2013. **75**(2): p. 246-250.
157. Thippeswamy, B.S., et al., *Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats*. Eur J Pharmacol, 2011. **654**(1): p. 100-105.
158. Kumar, G.K., et al., *Embelin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(6): p. 724-731.

159. Wu, T., et al., *Macrophage targeting contributes to the inhibitory effects of embelin on colitis-associated cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(15): p. 19548-19558.
160. Ko, J.H., et al., *The Application of Embelin for Cancer Prevention and Therapy*. *Molecules*, 2018. **23**(621): p. 1-14.
161. Schaible, A.M., et al., *Potent inhibition of human 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 by the anti-carcinogenic and anti-inflammatory agent embelin*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(4): p. 476-486.
162. Carter, G.W., et al., *5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991. **256**(3): p. 929-937.
163. Elkady, M., et al., *Modified Acidic Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs as Dual Inhibitors of mPGES-1 and 5-LOX*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012. **55**(20): p. 8958-8962.
164. Koeberle, A. and O. Werz, *Inhibitors of the Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 as Alternative to Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) – A Critical Review*. *Current Medicinal Chemistry*, 2009. **16**(32): p. 4274-4296.
165. Prakash, A.O., *Short term toxicity of embelin in female rats*. *Phytotherapy Research*, 1994. **8**(5): p. 257-264.
166. Johri, R.K., et al., *Toxicity studies with potassium embelate, a new analgesic compound*. *Indian J Exp Biol*, 1990. **28**(3): p. 213-217.
167. Poojari, R., et al., *Chemopreventive and hepatoprotective effects of embelin on N-nitrosodiethylamine and carbon tetrachloride induced preneoplasia and toxicity in rat liver*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010. **11**(4): p. 1015-1020.
168. Rashid, M., et al., *Development and Characterization of Drug-Loaded Self-Solid Nano-Emulsified Drug Delivery System for Treatment of Diabetes*. *Material Science Research India*, 2018. **15**(1): p. 01-11.
169. Edderkaoui, M., et al., *Ellagic Acid and Embelin Affect Key Cellular Components of Pancreatic Adenocarcinoma, Cancer, and Stellate Cells*. *Nutrition and Cancer*, 2013. **65**(8): p. 1232-1244.
170. Parmar, K., J. Patel, and N. Sheth, *Self nano-emulsifying drug delivery system for Embelin: Design, characterization and in-vitro studies*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015. **10**(5): p. 396-404.
171. Pathan, R.A. and U. Bhandari, *Preparation & characterization of embelin–phospholipid complex as effective drug delivery tool*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2011. **69**(1): p. 139-147.
172. Singh, B., et al., *Synthesis and anti-proliferative activities of new derivatives of embelin*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014. **24**(20): p. 4865-4870.
173. Chea, E.P. and H. Milstein, *Vitamin A*, in *StatPearls*. 2019, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
174. O'Reilly, K., S.J. Bailey, and M.A. Lane, *Retinoid-mediated regulation of mood: possible cellular mechanisms*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008. **233**(3): p. 251-258.
175. Evans, R.M. and D.J. Mangelsdorf, *Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang*. *Cell*, 2014. **157**(1): p. 255-266.
176. Jeyakumar, S.M. and A. Vajreswari, *Vitamin A as a key regulator of obesity & its associated disorders: Evidences from an obese rat model*. *Indian J Med Res*, 2015. **141**(3): p. 275-284.
177. Czarnewski, P., et al., *Retinoic Acid and Its Role in Modulating Intestinal Innate Immunity*. *Nutrients*, 2017. **9**(68): p. 1-15.
178. Myhre, A.M., et al., *Water-miscible, emulsified, and solid forms of retinol supplements are more toxic than oil-based preparations*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003. **78**(6): p. 1152-1159.
179. de Oliveira, M.R., *Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**(140267): p. 1-13.
180. Hathcock, J.N., et al., *Evaluation of vitamin A toxicity*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1990. **52**(2): p. 183-202.
181. Szuts, E.Z. and F.I. Harosi, *Solubility of retinoids in water*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991. **287**(2): p. 297-304.



182. Wilhelmus, K.R., *The Draize Eye Test*. Survey of Ophthalmology, 2001. **45**(6): p. 493-515.
183. Luepke, N.P., *Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential*. Food Chem Toxicol, 1985. **23**(2): p. 287-291.
184. Balls, M., et al., *The EC/HO international validation study on alternatives to the draize eye irritation test*. Toxicol In Vitro, 1995. **9**(6): p. 871-929.
185. Gilleron, L., et al., *Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy*. Toxicol In Vitro, 1996. **10**(4): p. 431-446.
186. Spielmann, H. and C. Reinhardt, *[OECD ist accepting test guidelines for validated in vitro toxicity tests in 1996]*. ALTEX, 1996. **13**(4): p. 167-174.
187. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. Journal of Morphology, 1951. **88**(3): p. 231-272.
188. Steiling, W., et al., *The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients*. Toxicology in Vitro, 1999. **13**(2): p. 375-384.
189. *National Institute of Environmental Health Sciences, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Appendix B3*. NIH Publication No. 10-7553, 2010.
190. Allen, W.E. and D.J. Wilson, *Early embryonic angiogenesis in the chick area vasculosa*. J Anat, 1993. **183**: p. 579-585.
191. Christ, B. and C.P. Ordahl, *Early stages of chick somite development*. Anatomy and Embryology, 1995. **191**(5): p. 381-396.
192. Rosenbruch, M., *Die frühen Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereis als Modell in der experimentellen Biologie und Medizin*. Altex, 1994. **11**(4): p. 199-206.
193. Müller, R., et al., *Optical detection of nanoparticle agglomeration in a living system under the influence of a magnetic field*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2015. **380**: p. 61-65.
194. Warncke, P. and D. Fischer, *Sicherheitsdiskussion - Nano ist nicht gleich Nano*. Pharmazeutische Zeitung, 2017. **23**: p. 1-8.
195. Chen, M.L., et al., *The BCS, BDDCS, and regulatory guidances*. Pharm Res, 2011. **28**(7): p. 1774-1778.
196. Amidon, G.L., et al., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm Res, 1995. **12**(3): p. 413-420.
197. Smetanova, L., et al., *Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2011. **54**(1): p. 3-8.
198. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-749.
199. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(2): p. 209-214.
200. Clayburgh, D.R., L. Shen, and J.R. Turner, *A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease*. Laboratory Investigation, 2004. **84**: p. 282-291.
201. Ungell, A.L. and J. Karlsson, *Cell cultures in drug discovery: an industrial perspective*. Drug bioavailability: Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability, 2003: p. 90-131.
202. Natoli, M., et al., *Good Caco-2 cell culture practices*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(8): p. 1531-1543.
203. Sohal, I.S., et al., *Ingested engineered nanomaterials: state of science in nanotoxicity testing and future research needs*. Particle and fibre toxicology, 2018. **15**(29): p. 1-31.
204. Hubatsch, I., E.G. Ragnarsson, and P. Artursson, *Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2111-2119.
205. Ravi Kumar, M.N.V., U. Bakowsky, and C.M. Lehr, *Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers*. Biomaterials, 2004. **25**(10): p. 1771-1777.

206. European Medicines Agency, *Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products*, in CPMP/ICH/279/95. 1998. p. 1-9.
207. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
208. Steinhilber, D., T. Herrmann, and H.J. Roth, *Separation of lipoxins and leukotrienes from human granulocytes by high-performance liquid chromatography with a Radial-Pak cartridge after extraction with an octadecyl reversed-phase column*. J Chromatogr, 1989. **493**(2): p. 361-366.
209. Barnes, A. and W. Jensen, *Blood volume and red cell concentration in the normal chick embryo*. Am J Physiol., 1959. **197**: p. 403-405.
210. Kind, C., *The development of the circulating blood volume of the chick embryo*. Anatomy and embryology, 1975. **147**(2): p. 127-132.
211. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products, in Appendix B3, National\_Institute\_of\_Environmental\_Health\_Sciences, Editor. 2010.
212. *Sicherheitsdatenblatt*, CarlRothGmbH, Editor. 2019. p. 1-18.
213. Sah, H., *Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres*. Journal of Controlled Release, 1997. **47**(3): p. 233-245.
214. Wisniewska, M., et al., *Investigation of the polyvinyl alcohol stabilization mechanism and adsorption properties on the surface of ternary mixed nanooxide AST 50 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>)*. J Nanopart Res, 2015. **17**(12): p. 1-14.
215. Voigt, R. and A. Fahr, *Pharmazeutische Technologie*. 11. ed. 2010: Deutscher Apotheker Verlag.
216. Fitz, E., *Dynamische Lichtstreuung zur Partikelgrößenbestimmung von CuZn-Hydroxykarbonaten*, in *Medizinisch-Physikalische Technik*. 2007, Technische Fachhochschule Berlin: Berlin. p. 1-54.
217. Müller, R.H. and C.M. Keck, *Moderne Pharmazeutische Technologie*. Kapitel 3.2. Photonenkorrelationsspektroskopie. 2009.
218. Danaei, M., et al., *Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. Pharmaceutics, 2018. **10**(57): p. 1-17.
219. Lee, S.C., et al., *Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration*. Journal of Controlled Release, 1999. **59**(2): p. 123-132.
220. Manchanda, R., et al., *Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 260-267.
221. *VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*. 2005, International\_Council\_for\_Harmonisationof\_Technical\_Requirements\_for\_Pharmaceuticals\_for\_Human\_Use. p. 1-13.
222. Piron, E. and A. Domard, *Interaction between chitosan and uranyl ions. Part 2. Mechanism of interaction*. International Journal of Biological Macromolecules, 1998. **22**(1): p. 33-40.
223. Loveday, S.M. and H. Singh, *Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods*. Trends in Food Science & Technology, 2008. **19**(12): p. 657-668.
224. Abernethy, D.R., J. Woodcock, and L.J. Lesko, *Pharmacological mechanism-based drug safety assessment and prediction*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(6): p. 793-797.
225. Alkhatib, Y., et al., *Controlled extended octenidine release from a bacterial nanocellulose/Poloxamer hybrid system*. Eur J Pharm Biopharm, 2017. **112**: p. 164-176.
226. *Use of International Standard ISO-10993, "Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing*. 2013, U.S.\_Food\_&\_Drug\_Administration.

227. Al-Nazhan, S. and L. Spangberg, *Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells*. Journal of Endodontics, 1990. **16**(3): p. 129-134.
228. Inacio, A.S., et al., *In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. 1-15.
229. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer Copyright 2015, The Author(s). Cham (CH). p. 103-111.
230. Kraft, M.R., et al., *Giardia's Epithelial Cell Interaction In Vitro: Mimicking Asymptomatic Infection?* Frontiers in cellular and infection microbiology, 2017. **7**(421): p. 1-13.
231. van Breemen, R.B. and Y. Li, *Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. **1**(2): p. 175-185.
232. Rodrigues, S., et al., *Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery*. J Funct Biomater, 2012. **3**(3): p. 615-641.
233. Behzadi, S., et al., *Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell*. Chemical Society reviews, 2017. **46**(14): p. 4218-4244.
234. Daina, A. and V. Zoete, *Application of the SwissDrugDesign Online Resources in Virtual Screening*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(18): p. 1-12.
235. Aminpour, M., C. Montemagno, and J.A. Tuszynski, *An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications*. Molecules (Basel, Switzerland), 2019. **24**(9): p. 1-30.
236. Li, Z., et al., *Design, synthesis and evaluation of novel diaryl-1,5-diazoles derivatives bearing morpholine as potent dual COX-2/5-LOX inhibitors and antitumor agents*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2019. **169**: p. 168-184.
237. Koeberle, A. and O. Werz, *Natural products as inhibitors of prostaglandin E2 and pro-inflammatory 5-lipoxygenase-derived lipid mediator biosynthesis*. Biotechnology Advances, 2018. **36**(6): p. 1709-1723.
238. Cai, J., et al., *PLGA nanoparticle-based docetaxel/LY294002 drug delivery system enhances antitumor activities against gastric cancer*. J Biomater Appl, 2019. **33**(10): p. 1394-1406.
239. Trujillo-Nolasco, R.M., et al., *Preparation and in vitro evaluation of radiolabeled HA-PLGA nanoparticles as novel MTX delivery system for local treatment of rheumatoid arthritis*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019. **103**(109766): p. 1-11.
240. Lee, S., et al., *Intravenous sustained-release nifedipine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by restoring autophagic clearance*. Biomaterials, 2019. **197**: p. 1-11.
241. Qi, F., et al., *Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects*. Frontiers of Chemical Science and Engineering, 2019. **13**(1): p. 14-27.
242. Anselmo, A.C. and S. Mitragotri, *Nanoparticles in the clinic: An update*. Bioengineering & translational medicine, 2019. **4**(3): p. 1-16.
243. Klinger-Strobel, M., et al., *A blue fluorescent labeling technique utilizing micro- and nanoparticles for tracking in LIVE/DEAD((R)) stained pathogenic biofilms of Staphylococcus aureus and Burkholderia cepacia*. Int J Nanomedicine, 2016. **11**: p. 575-583.
244. Chattopadhyay, D.P. and M.S. Inamdar, *Aqueous Behaviour of Chitosan*. International Journal of Polymer Science, 2010. **2010**: p. 1-7.
245. Nafee, N., et al., *Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides*. Nanomedicine, 2007. **3**(3): p. 173-183.
246. Costa, C.N., et al., *Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride*. Carbohydrate Polymers, 2015. **133**: p. 245-250.
247. Simon, L.C., R.W. Stout, and C. Sabliov, *Bioavailability of Orally Delivered Alpha-Tocopherol by Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid (PLGA) Nanoparticles and Chitosan Covered PLGA Nanoparticles in F344 Rats*. Nanobiomedicine, 2016. **3**(8): p. 1-10.

248. Paliwal, R., R.J. Babu, and S. Palakurthi, *Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges*. AAPS PharmSciTech, 2014. **15**(6): p. 1527-1534.
249. Wüstenberg, T., *Cellulose und Cellulosederivate: Grundlagen, Wirkungen und Applikationen*. 2013: Behr's Verlag.
250. Robertson, J.D., et al., *Purification of Nanoparticles by Size and Shape*. Scientific Reports, 2016. **6**(27494): p. 1-9.
251. Vetten, M.A., et al., *Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014. **10**(7): p. 1391-1399.
252. Dhoke, D.M., S.S. Basaiyye, and P.B. Khedekar, *Development and characterization of L-HSA conjugated PLGA nanoparticle for hepatocyte targeted delivery of antiviral drug*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018. **47**: p. 77-94.
253. Lu, B., X. Lv, and Y. Le, *Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery*. Polymers, 2019. **11**(304): p. 1-14.
254. Kozaki, M., et al., *Evaluating the Properties of Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticle Formulations Encapsulating a Hydrophobic Drug by Using the Quality by Design Approach*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2017. **65**(3): p. 218-228.
255. Shirsat, A.E. and S.S. Chitlange, *QUALITY BY DESIGN APPROACH TO OPTIMIZATION OF TACROLIMUS LOADED PLGA NANOPARTICLES*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2015. **6**(10): p. 4342-4353.
256. Wang, Y., P. Li, and L. Kong, *Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery*. AAPS PharmSciTech, 2013. **14**(2): p. 585-592.
257. Ghobadi, E., et al., *Simulation of Volumetric Swelling of Degradable Poly[(Rac-Lactide)-Co-Glycolide] Based Polyesterurethanes Containing Different Urethane-Linkers*. Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials, 2012. **10**(3): p. 293-301.
258. Malik, S. and R. Bahal, *Investigation of PLGA nanoparticles in conjunction with nuclear localization sequence for enhanced delivery of anti-miR phosphorothioates in cancer cells in vitro*. Journal of nanobiotechnology, 2019. **17**(57): p. 1-13.
259. Chen, J., et al., *Dual tumor-targeted poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol-folic acid nanoparticles: a novel biodegradable nanocarrier for secure and efficient antitumor drug delivery*. International journal of nanomedicine, 2017. **12**: p. 5745-5760.
260. Bazile, D.V., et al., *Body distribution of fully biodegradable [14C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats*. Biomaterials, 1992. **13**(15): p. 1093-1102.
261. Billion-Rey, F., et al., *Stability of fat-soluble vitamins A (retinol palmitate), E (tocopherol acetate), and K1 (phyloquinone) in total parenteral nutrition at home*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1993. **17**(1): p. 56-60.
262. N'Soukpoe-Kossi, C.N., et al., *Retinol and retinoic acid bind human serum albumin: stability and structural features*. Int J Biol Macromol, 2007. **40**(5): p. 484-490.
263. de Carvalho Melo-Cavalcante, A.A., et al., *Retinol palmitate and ascorbic acid: Role in oncological prevention and therapy*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019. **109**: p. 1394-1405.
264. Wang, H., et al., *Improved photostability of Vitamin A palmitate originating from self-assembled supramolecular gels*. Chinese Science Bulletin, 2012. **57**(33): p. 4257-4263.
265. *IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C(R6)*. 2019, International\_Council\_for\_Harmonisationof\_Technical\_Requirements\_for\_Pharmaceuticals\_for\_Human\_Use. p. 1-39.
266. Wen, X., et al., *Nanomedicine strategy for optimizing delivery to outer hair cells by surface-modified poly(lactic/glycolic acid) nanoparticles with hydrophilic molecules*. Int J Nanomedicine, 2016. **11**: p. 5959-5969.
267. Patar, A., et al., *Cell viability in three ex vivo rat models of spinal cord injury*. J Anat, 2019. **234**(2): p. 244-251.

268. Tavaszi, J. and P. Budai, *The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation*. Commun Agric Appl Biol Sci, 2007. **72**(2): p. 137-141.
269. Fullstone, G., et al., *Modelling the Transport of Nanoparticles under Blood Flow using an Agent-based Approach*. Scientific Reports, 2015. **5**(10649): p. 1-13.
270. Yi, X., et al., *Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro*. FEBS open bio, 2017. **7**(4): p. 485-494.
271. Jeong, H., et al., *In vitro blood cell viability profiling of polymers used in molecular assembly*. Scientific Reports, 2017. **7**(9481): p. 1-13.
272. Worthley, E.G. and C.D. Schott, *The toxicity of four concentrations of DMSO*. Toxicol Appl Pharmacol, 1969. **15**(2): p. 275-281.
273. *Dimethylsulfoxid (DMSO)*. 2009, MAK-Kommission. p. 1-11.
274. Abdelkader, H., et al., *Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals*. British Medical Bulletin, 2015. **113**(1): p. 59-71.
275. Derman, S., et al., *The Study Of Synthetic Peptide Loaded PLGA Nanoparticles Cytotoxicity In Vitro*. Fresenius Environmental Bulletin, 2017. **26**(2a): p. 1646-1653.
276. Stephan Raj, T.L., *In-vitro Cytotoxicity Studies on Methanolic Leaf Extract of Embelia Ribes Burm F - an Important Traditional Medicinal Plant of Kerala*. Advances in Cytology & Pathology, 2016. **1**(1): p. 6-8.
277. Zhang, Y., *Overview of Transporters in Pharmacokinetics and Drug Discovery*. Curr Protoc Pharmacol, 2018. **82**(1): p. 1-46.
278. He, C., et al., *Vitamin A inhibits the action of LPS on the intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins*. Food Funct, 2019. **10**(2): p. 1235-1242.
279. Ross, A.C., *Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(5): p. 1166-1172.
280. During, A. and E.H. Harrison, *Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells*. J Lipid Res, 2007. **48**(10): p. 2283-2294.
281. Napoli, J.L., *Functions of Intracellular Retinoid Binding-Proteins*. Subcell Biochem, 2016. **81**: p. 21-76.
282. Chelstowska, S., et al., *Molecular Basis for Vitamin A Uptake and Storage in Vertebrates*. Nutrients, 2016. **8**(11): p. 1-24.
283. Seyedian, S.S., F. Nokhostin, and M.D. Malamir, *A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease*. Journal of medicine and life, 2019. **12**(2): p. 113-122.
284. Li, H., et al., *High-throughput screening for fatty acid uptake inhibitors in humanized yeast identifies atypical antipsychotic drugs that cause dyslipidemias*. J Lipid Res, 2008. **49**(1): p. 230-244.
285. Rezvantab, S., et al., *PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**(1260): p. 1-19.
286. Lu, H., et al., *Recent progress on nanostructures for drug delivery applications*. Journal of Nanomaterials, 2016. **2016**(5762431): p. 1-12.
287. Brungs, M., et al., *On the Induction of 5-Lipoxygenase Expression and Activity in HL-60 Cells: Effects of Vitamin D3, Retinoic Acid, DMSO and TGF $\beta$* . Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **205**(3): p. 1572-1580.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die von mir vorgelegte Arbeit durch meine Person selbständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Literatur angefertigt wurde. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, habe ich in jedem einzelnen Fall durch die Angabe der Quelle, auch der benutzten Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen in Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität Jena als Prüfungsarbeit eingereicht, wo mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist.

---

Sven-Desiderius Kattner

Erfurt, den 25. November 2020